

Giovana Andreia Gibbert de Souza

Atividade farmacológica do óleorresina da

Copaifera reticulata

em modelo experimental de *Malária*
com camundongos BALB/c



Atena
Editora
Ano 2023

Giovana Andreia Gibbert de Souza

Atividade farmacológica do óleorresina da

Copaifera reticulata

em modelo experimental de *Malária*
com camundongos BALB/c



Atena
Editora
Ano 2023

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Ellen Andressa Kubisty

Luiza Alves Batista

Nataly Evilin Gayde

Thamires Camili Gayde

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2023 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2023 Os autores

Copyright da edição © 2023 Atena

Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva da autora, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos ao autora, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial

Ciências Biológicas e da Saúde

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Camila Pereira – Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto

Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí

Profª Drª Danyelle Andrade Mota – Universidade Tiradentes

Prof. Dr. Davi Oliveira Bizerril – Universidade de Fortaleza

Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina

Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília

Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina

Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra

Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Guillermo Alberto López – Instituto Federal da Bahia

Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia

Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Delta do Parnaíba–UFDPAr

Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Kelly Lopes de Araujo Appel – Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal

Profª Drª Larissa Maranhão Dias – Instituto Federal do Amapá

Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Luciana Martins Zuliani – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas

Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará

Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Max da Silva Ferreira – Universidade do Grande Rio

Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino

Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará

Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Taísa Ceratti Treptow – Universidade Federal de Santa Maria

Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí

Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Atividade farmacológica do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelo experimental de Malária com camundongos BALB/c

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Flávia Roberta Barão
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: A autora
Autora: Giovana Andreia Gibbert de Souza

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
S729	Souza, Giovana Andreia Gibbert de Atividade farmacológica do óleo-resina da <i>Copaifera reticulata</i> em modelo experimental de Malária com camundongos BALB/c / Giovana Andreia Gibbert de Souza. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-1590-9 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.909230908 1. Malária. I. Souza, Giovana Andreia Gibbert de. II. Título. CDD 616.936
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná – Brasil
 Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DA AUTORA

A autora desta obra: 1. Atesta não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declara que participou ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certifica que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirma a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhece ter informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autoriza a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

Ao meu esposo Juarez pelo amor, carinho e compreensão além do incentivo e apoio em minhas decisões.

Aos meus filhos, Julia, Luísa e Théo, pelos momentos de alegria e ternura desde sempre, mesmo quando estive ausente.

Aos meus orientadores, Dr. Waldiney Pires Moraes e Dra. Karen Renata M. Oliveira, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa e por todos os ensinamentos, científicos e pessoais.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Oeste do Pará, o LabFar, em especial à Nazaré Carneiro e à Suellen Gonçalves, minhas parceiras de experimentos e viagens.

Aos colegas do da 1ª turma do mestrado em Biociências, Andréa Nunes, Daliane Marinho, Amanda Ricartt, Helen Soares, Juliana Almeida, Juliana Portela, Lúcio Meireles, Maria Beatriz dos Santos, Monica Pinheiro, Osvaldo Nunes Neto e Suelen Ricarte, pelo companheirismo em todos os momentos, de risos ou choros, e por termos resistido. Saímos da Caverna do Dragão.

À Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, ao Programa Pró-Amazônia, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Pará – FAPESPA, por ter proporcionado através do Programa de Pós-Graduação em Biociências, com que pudéssemos fazer ciência, seja através do apoio às temáticas voltadas à Região Amazônica e pelo financiamento que possibilitou do desenvolvimento da pesquisa.

"De três maneiras se adquire a sabedoria:
a primeira é pela reflexão, que é a mais nobre;
a segunda, pela imitação, que é a mais simples;
a terceira é pela experiência, que é a mais amarga."

Confúcio (551-479 a.C.)

Caros leitores,

É com grande entusiasmo que lhes apresento a obra “ Atividade farmacológica do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelo experimental de Malária com camundongos BALB/c”. Neste livro, adentramos um universo fascinante onde a ciência e a pesquisa se entrelaçam para desvendar os segredos por trás da ação farmacológica da Copaíba no contexto do combate à malária.

Ao longo das páginas que se seguem, mergulharemos fundo nas intrincadas nuances do mundo das plantas medicinais e de como elas podem oferecer soluções inovadoras no enfrentamento de doenças tão complexas quanto a malária. Através de rigorosos métodos experimentais, exploramos o impacto da Copaíba nesse cenário, descobrindo como seus componentes ativos podem potencialmente se tornar valiosos aliados na luta contra um dos maiores desafios da medicina.

Nossa jornada nos conduzirá por um roteiro científico minucioso, detalhando o processo de investigação que nos levou a compreender os efeitos bioquímicos e os resultados promissores obtidos em nossos experimentos. Além disso, também abordaremos as implicações clínicas dessas descobertas e como elas podem impactar diretamente a abordagem terapêutica da malária.

Ao apresentar esta obra, tenho a esperança de que cientistas, profissionais da saúde e entusiastas da pesquisa encontrem neste livro não apenas informações valiosas, mas também a inspiração para continuar explorando as maravilhas da natureza em prol da saúde humana. Que as páginas que vocês estão prestes a ler possam iluminar novos caminhos na busca por tratamentos mais eficazes e acessíveis para uma das doenças mais desafiadoras de nosso tempo.

A todos que compartilham do mesmo fascínio pela ciência e pela descoberta, desejo uma leitura enriquecedora e instigante.

Cordialmente,

Giovana A. Gibbert de Souza

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina tri-fosfato
CD4	Cluster of Differentiation 4, molécula expressa na superfície de células T, macrófagos, monócitos e células dendríticas.
CD5	Cluster of Differentiation 5, molécula expressa na superfície de células T, macrófagos, monócitos e células dendríticas..
CD8	Molécula expressa na superfície de células T, macrófagos, monócitos e células dendríticas.
CD11b	Cluster of Differentiation 11b, molécula expressa na superfície de células T, macrófagos, monócitos e células dendríticas.
CD19	Cluster of Differentiation 19, molécula expressa na superfície de células T, macrófagos, monócitos e células dendríticas.
CD125	Cluster of Differentiation 125, molécula expressa na superfície de células T, macrófagos, monócitos e células dendríticas.
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média.
e.p.m.	Erro padrão da média
Fe(III)PPIX	Ferriprotoporfirina IX
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
ISCO	Instituto de Saúde Coletiva
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
MCH	Hemoglobina corpuscular média
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Ácido Para-aminobenzóico
PLT	Plaquetas
PNCM	Plano Nacional de Controle da Malária
NK	Células Natural Killers
RBC	Glóbulos vermelhos
T _{reg}	Linfócito T regulatório
Th1	Linfócito T Helper do tipo 1
TGF- β	Fator de crescimento transformador – β
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UNICAMP	Universidade de Campinas
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
WBC	Glóbulos brancos

INTRODUÇÃO	1
A MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL	1
CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA	3
CICLO BIOLÓGICO DO PLASMÓDIO	4
PATOGENIA DA MALÁRIA	5
Alterações hematológicas na malária	6
Lesão renal na malária	6
Lesão hepática na malária	7
Reposta imunológica na malária	8
DROGAS ANTIMALÁRICAS.....	9
Mecanismo de ação dos antimalaricos	10
Inibidores da produção de hemozoína.....	10
Inibidores de ácido fólico	10
Inibidores da transcrição procariótica	10
Inibidores do transporte de elétrons mitocondrial	11
BUSCA DE PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTIMALÁRICA.....	11
O gênero <i>Copaifera</i>	11
Caracterização do oleorresina de <i>Copaifera reticulata</i>	12
Propriedades medicinais do oleorresina do gênero <i>Copaifera</i>	13
UTILIZAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS EM MALÁRIA.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
AQUISIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO OLEORRESINA DE <i>COPAIFERA RETICULATA</i>	17
ANIMAIS.....	17
AValiação DA TOXICIDADE AGUDA	17
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	18
MANUTENÇÃO DA CEPA DE <i>PLASMODIUM BERGHEI</i>	19

INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	19
DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA E SUPRESSÃO PARASITÊMICA.....	20
ANÁLISE DE SOBREVIDA PÓS TRATAMENTO COM OLEORRESINA DE <i>C. RETICULATA</i>	20
DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA	20
PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA.....	21
Determinação da atividade da Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)	21
Análise da concentração de Bilirrubina Total, Direta e Indireta	21
Avaliação da atividade da Enzima Fosfatase Alcalina	21
PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL	21
Determinação dos níveis plasmáticos de Creatinina e Uréia.....	21
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	21
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
RESULTADOS	24
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	24
ANÁLISE QUANTITATIVA DA EVOLUÇÃO DA PARASITEMIA E DOS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PLASMÁTICA	24
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA	26
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL	30
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	31
AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIDA DOS ANIMAIS	33
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS	44
SOBRE A AUTORA	51

INTRODUÇÃO

1.1 A MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL

A malária está entre as mais importantes doenças parasitárias que acomete o homem, somente no ano de 2013 acometeu cerca de 198 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que destes 550 mil pessoas morreram das complicações que a malária pode causar (OPAS, 2015). Apesar de ser um problema global, a malária não apresenta uma distribuição geográfica homogênea, sendo que a sua incidência mundial se concentra em regiões tropicais e subtropicais como África, América Latina e Ásia (RIDDER et al., 2008; AMIR; AHMADIAN, 2009). Aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas vivem em áreas consideradas de risco de transmissão da malária (FREITAS, 2007; SZMITKO; KOHN; SIMOR, 2009; OPAS, 2015). Cerca de 90% dos casos mundiais ocorrem na África Subsaariana, 2/3 dos casos restantes se distribuem entre o Brasil, Índia e Sirilanka (GERMANO; MENDONÇA; MURINELLA, 2006; OPAS, 2015).

A malária tem como agente etiológico o parasito do gênero *Plasmodium* e entre as espécies causadoras da doença ao homem estão o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*. A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo a mais importante a espécie de *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são locais com água limpa, quente e área sombreada, com maior prevalência em regiões tropicais (BRASÍLIA, 2010a).

O Brasil apresenta 60% do seu território em condições favoráveis para transmissão dos plasmódios (FREITAS et al., 2007). Esta situação se traduz em números divulgados pelo Ministério da Saúde, onde somente ano de 2011 foram notificados aproximadamente 349.000 casos de malária em todo país. Em 2011, a Região Amazônica apresentou 266.348 casos confirmados, onde somente o Pará apresentou um montante de 114.752 casos notificados (BRASIL, 2013). Este dado da Região Amazônica se diverge ao ser comparado ao estudo realizado por Pina-Costa et al. (2014), que apontou no mesmo ano de 2011 um quantitativo de cerca de 320.000 novos casos confirmados (Fig. 01). Quando são analisadas as relações entre casos notificados e as espécies de plasmódios, podemos perceber uma diferença entre os agentes causadores da Malária. No Brasil não há registro de infecções autóctone pelo *P. ovale* e a espécie de maior incidência é o *P. vivax* responsável por quase 90% dos casos notificados de malária (BRASÍLIA, 2010a; BRASIL, 2013; PINA-COSTA et al, 2014).

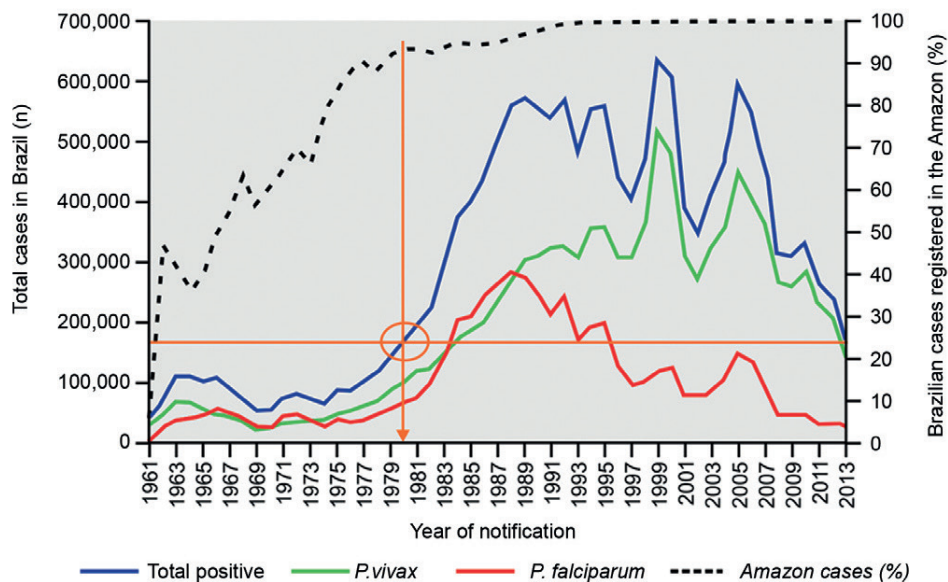


Fig. 01: Número de casos de malária notificados no período de 1961 a 2013, de acordo com as espécies de plasmódio na região Amazônica (PINA-COSTA et al., 2014).

A busca por métodos de controle da doença no Brasil trouxe alguns avanços nos últimos anos, havendo uma redução significativa da transmissão de malária pelo *P. falciparum* e como esta espécie é responsável pela forma grave e complicada da doença, o número de internações por malária também sofreu uma queda e passou de 2,6% em 2003 para 1,3% no ano de 2008. Entretanto, fatores como o desenvolvimento da região amazônica, o avanço do homem sobre a floresta, e a extensa área territorial, que chega a 6,9 milhões de Km², dificulta um controle mais efetivo da doença, e torna praticamente impossível a erradicação desta parasitose no Brasil. Atualmente o Ministério da Saúde segue a recomendação da OMS, de que os programas de erradicação da malária se transformem em programas de controle da doença. Este processo fez com que atenção ao doente ficasse em primeiro plano, e hoje os objetivos do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) são de reduzir a letalidade e a gravidade dos casos, diminuir a incidência da doença, eliminar a transmissão em áreas urbanas e manter a ausência da doença em locais onde a transmissão já foi interrompida. Para que estes objetivos sejam atingidos e o combate à malária seja cada vez mais efetivo é necessário que se conheça profundamente as características fisiopatológicas da doença (BRASÍLIA, 2001).

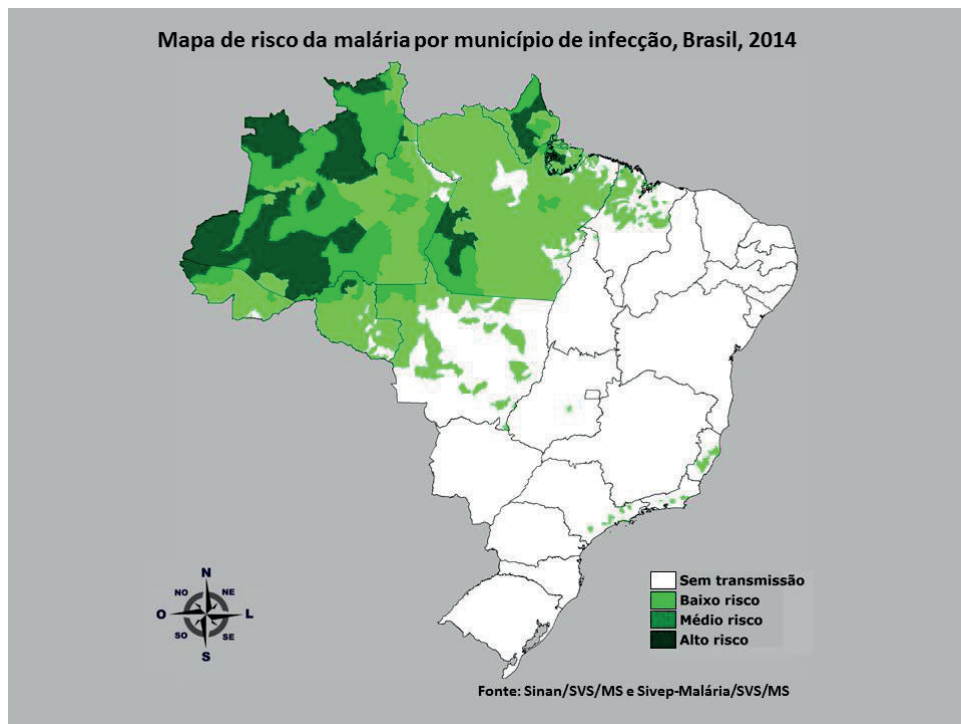


Fig. 02: Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual (BRASIL, 2015).

1.2 CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA

A malária tem como agente etiológico o protozoário da classe *Sporozoa*, da família *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium* e das espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium mlarie* (GOMES et al., 2011). A infecção pelo plasmódio pode seguir dois cursos clínicos de evolução de acordo com a espécie de plasmódio, a forma simples ou não complicada da malária e a forma grave ou complicada da doença, cuja classificação ocorre de acordo com os sintomas e consequências clínicas que a malária promove. Na forma simples o paciente apresenta um quadro clínico clássico de febre cíclica, seguido de intenso calafrio e sudorese profusa, náuseas, vômito, palidez, debilidade física, sem parasitemia intensa ou outras complicações. Malária grave normalmente é causada pelo *P. falciparum*, e o paciente pode apresentar intensa parasitemia, o que gera complicações como esplenomegalia, dor de cabeça grave, isquemia, lesões cerebrais, convulsões, vômito intenso, hepatomegalia, hemoglobinúria, hipoglicemia, coagulopatias, acidose metabólica, complicações pulmonares, insuficiência renal podendo evoluir ao coma e morte (RIDDER et al., 2008; BRASÍLIA, 2010a; HANSEN; SCHOFIELD, 2010).

As complicações e o índice de letalidade da malária são maiores em indivíduos

com debilidade imunológica. Pacientes imunossuprimidos, gestantes e crianças são mais susceptíveis ao quadro grave da doença. Dentre as complicações a insuficiência renal aguda e malária cerebral aparecem como as principais causas de morte entre as crianças, já o quadro de edema pulmonar agudo é mais comum em gestantes (BRASÍLIA, 2001; HERMIDA et al., 2008).

1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PLASMÓDIO

A infecção inicia-se através da picada do mosquito do gênero *Anopheles*, que inocula os esporozoítas na corrente sanguínea, através da sua saliva. Quando estes esporozoítas atingem os hepatócitos, dentro de 30 a 60 minutos após a inoculação estes se multiplicam e dão origem às formas merozoíticas do parasito que ao romper os hepatócitos atingem a corrente sanguínea e invadem os eritrócitos; nesta fase ocorre o início dos sintomas promovidos pela malária (BRASÍLIA, 2001; FREVERT et al., 2009). No eritrócito, os merozoítas se transformam em trofozoítas, e após a divisão nuclear, passam a esquizontes sanguíneos, que sofrem novamente uma divisão, e originarão novos merozoítas. É a fase de esquizogonia que se difere entre as espécies dando origem a características clínicas distintas nas infecções (GOMES et al., 2011). Nas infecções por *P. vivax* ou *P. falciparum* o ciclo eritrocitário se repete a cada 48 horas e nas infecções por *P. malarie* este ciclo acontece a cada 72 horas. A formação dos gametas ocorre após algumas gerações de merozoítos, os gametócitos formados, quando são ingeridos pelos insetos vetores, irão fecundar e dar origem a fase sexuada do ciclo.

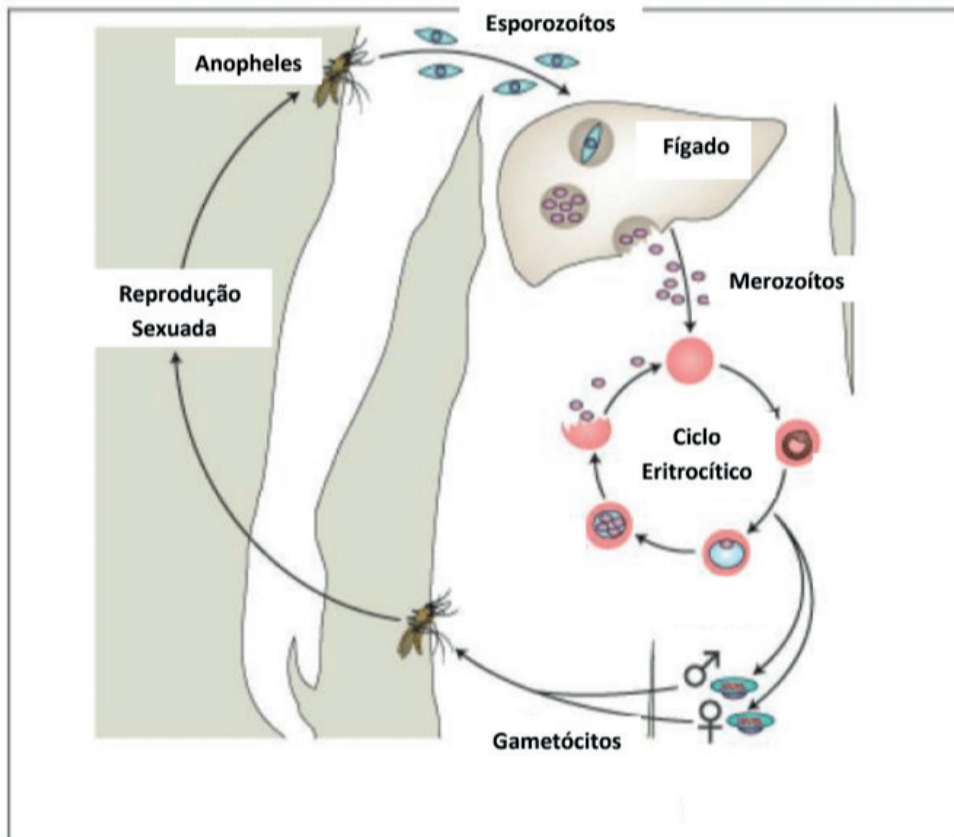


Fig. 03: Ciclo vital do *Plasmodium falciparum* (adaptado de ROWE et al., 2010).

1.4 PATOGENIA DA MALÁRIA

As gravidades do quadro malárico mantêm relação entre o hospedeiro e a espécie de plasmódio que promoveu a infecção, além da densidade parasitária promovida pelo plasmódio. Além da ação do plasmódio em seu ciclo biológico, alguns fatores relacionados ao hospedeiro interferem no quadro, como a resposta imunológica promovida, a idade e o estado nutricional, quadros de primo infecção e infecções mistas podem ser agravantes no prognóstico da doença (GOMES et al., 2011). A ação sistêmica do parasito promove complicações fisiopatológicas sobre os diversos órgãos, atingindo principalmente o cérebro, rins e fígado.

O *Plasmodium falciparum* demonstra ser o agente mais patogênico e letal da malária. Esta espécie é responsável por promover um alto índice de complicações, estando envolvido em 90 % dos casos de morte pela doença. Já o *Plasmodium vivax* é responsável por uma forma menos agressiva, porém este mantém formas parasitárias latentes (hipinozoítos) armazenadas no tecido hepático. Os hipinozoítos podem causar re-infecções em até cinco

anos após do contágio (RIDDEERS et al., 2008).

1.4.1 Alterações hematológicas na malária

As alterações hematológicas mais frequentemente associadas à infecção malárica são anemia, leucopenia, trombocitopenia, eosinopenia e neutropenia (DAVIS et al., 1991; HANSCHIED et al., 2008). Tais alterações hematológicas podem apresentar variação de acordo com a idade do indivíduo, o estado nutricional deficiente, a presença de parasitoses intestinais e também conforme a imunidade antimalárica deste indivíduo (SIEKMANS; RECEVEUR; HADDAD, 2014).

A anemia é a manifestação mais frequente, sendo causada por múltiplos fatores, como a destruição ou sequestro de eritrócitos, alterações na eritropoiese mediada pelo aumento da produção de IL-6, e ainda a perda sanguínea ocorrida por alterações na coagulação (GOMES et al., 2011). Além disso observamos uma forte relação entre os mecanismos imunológicos e as alterações hematológicas, proporcionada pela atividade de imunocomplexos que sensibilizam eritrócitos, a atividade de auto-anticorpos que podem induzir a hemólise de células infectadas e não infectadas (FERNANDES et al., 2008) e também o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias que estimulariam a eritrofagocitose (CLARK et al., 2006).

A anemia é descrita como um dos principais agravos na malária ocorrendo principalmente em primo-infectados, gestantes e crianças (COURA JR, 2006.). Em todas as infecções por malária, independente do plasmódio responsável pela infecção, a anemia ocorre, porém no quadro infeccioso pelo *P. falciparum* é mais grave pela afinidade tanto por reticulócitos quanto por eritrócitos (ALECRIM, ESPINOSA, ALECRIM, 2000). Fatores estes que somados podem agravar o quadro de infecção malárica, aumentando acentuadamente o risco de morte do paciente.

1.4.2 Lesão renal na malária

As hipóteses que explicam a falência renal sugerem uma obstrução da microcirculação mediada pela aderência de eritrócitos infectados ao endotélio vascular, pela diminuição da deformabilidade dos eritrócitos. Este processo somado a uma resposta imune glomerular contribui para o déficit na função renal (DIS BORNE, 2008, GOMES et al., 2011).

A patogênese renal tem sido bem descrita como manifestação clínica em infecções causadas pelo *P. falciparum*, esta lesão atinge não somente o glomérulo, mas também os túbulos intersticiais e mediadores pro-inflamatórios tais como as citocinas, oxigênio reativo e óxido nítrico parecem ter participação efetiva neste processo (NERI et al., 2008), além de eventos hemodinâmicos, como a lentificação de fluxo sanguíneo, hipovolemia e redução da viscosidade, as alterações metabólicas e a elevação sérica de ureia e creatinina.

Atividade humoral, migração de leucócitos, células mononucleares completam

o quadro fisiopatológico e o curso clínico da doença, o que pode culminar em uma hipoperfusão renal leve ou evoluir para um quadro grave promovendo uma insuficiência renal aguda (DIS BORNE, 2008).

1.4.3 Lesão hepática na malária

As complicações hepáticas durante a infecção pelos plasmódios resultam em sinais e sintomas como as alterações glicêmicas provocadas pela diminuição da gliconeogênese, distúrbios de coagulação, vômito, anorexia, uremia, além de agravarem a lesão renal e cerebral na malária (GOMES et al., 2011).

A fase eritrocítica do ciclo biológico do parasito contribui para elevação sérica de bilirrubina, e em casos de intensa parasitemia os níveis de bilirrubina excedem os valores normais promovendo um quadro de icterícia (BHALLA; SURI; SINGH, 2006). Os níveis séricos das aminotransferases apresentam-se elevados, porém apresenta características histopatológicas distintas, provocadas por complicações vasculares e ao estresse oxidativo mediado pela resposta imune (DEY et al., 2009, GOMES et al., 2011). As enzimas AST e ALT são utilizadas como marcadores de lesão hepática, sendo que a enzima AST ocorre dentro do hepatócito, nas formas de isoenzimas citosólicas e mitocondrial, sendo encontrada também nas células musculares cardíacas e musculo-esqueléticas e ainda nos rins. A enzima ALT, além de ser encontrada no hepatócito, é encontrada no tecido renal, porém se mostra menos abundante que a AST (AGUENA, 2010).

Além disso, a citoaderência e o sequestro de eritrócitos infectados promovem a obstrução microvascular que pode levar a danos circulatórios resultando em pontos de isquemia hepática. Em infecções severas temos a oclusão de ramos venosos portal o que podem contribuir para uma complicação hepática grave (BHALLA; SURI; SINGH, 2006).

Outros estudos demonstraram a presença de danos colaterais causados pela resposta imunológica e formação de radicais livres. O estresse oxidativo pode estar associado à indução da via de apoptose dos hepatócitos. Este processo pode ser demonstrado na tentativa de detoxificação do grupamento heme liberado durante a hemólise induzida pelo plasmódio, o grupamento demonstra ter propriedades pró-inflamatórias que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio o que somado ao fator de necrose tumoral (TNF- α), liberado durante a infecção, levam ativação de caspases presentes em vias apoptóticas (SAHU et al., 2010).

A lesão hepática se torna um agravante do quadro de pacientes com malária grave, provocada pelo *P. falciparum*, onde a hemólise intensa associada a uma falha no metabolismo hepático da bilirrubina resultam no aumento da concentração plasmática de bilirrubina indireta.

1.4.4 Resposta imunológica na malária

A cascata imunológica desencadeada após a contaminação pelo plasmódio promove a indução das duas vias levando a proliferação, tanto de linfócitos T CD4 quanto de T CD8, sendo que as células T CD8 parecem ser mais efetivas no combate desta infecção. Existe um elo entre as duas vias que é mediado pela interleucina-2 (IL-2) a qual é produzida em maior quantidade pelas células T CD4⁺, e tem como função básica a indução da progressão de linfócitos T da fase G1 para fase S do ciclo celular aumentando a proliferação de linfócitos T CD8, células NK, além de agir como fator autócrino na proliferação de linfócitos T CD4 e progressão da resposta Th1 (YOSHIMOTO et al., 1998).

Apesar da infecção pelos plasmódios não promover uma memória imunológica permanente, sabemos que os moradores de áreas endêmicas, os quais sofrem com infecções recorrentes, normalmente adquirem uma imunidade parcial ao parasito. Este mecanismo de defesa do hospedeiro não é sustentado, o que não impede que o mesmo se infecte novamente (RIDDER et al., 2008; SAHU et al., 2010). Em áreas endêmicas, a população mais susceptível as complicações da malária são as crianças menores de cinco anos que sofreram poucas ou nenhuma infecção pelo plasmódio. Isso demonstra importância e a capacidade que o sistema imune adquire devido à exposição contínua ao patógeno (HANSEN; SCHOFIELD, 2010).

Sabemos que a presença ativa de mecanismos mediados por linhagens de linfócitos T citotóxicos é crucial para o controle natural da infecção. Entretanto, esta resposta envolve o aumento da presença de mediadores destrutivos, os quais podem resultar em efeitos deletérios que atingem as próprias células do hospedeiro. A regulação natural da resposta imune exercida por linhagens específicas de linfócitos T, conhecidos como Linfócitos T_{reg}, é de extrema importância neste balanço homeostático, coibindo assim a exacerbação auto-imune. A desregulação deste equilíbrio pode gerar um quadro de imunopatogenicidade que é mediado por citocinas como o TNF- α , interleucinas, INF- γ , além da migração de células efectoras como linfócitos T CD4 e CD8, células NK e macrófagos. Ocorre também a expressão de moléculas de adesão intercelular promovendo à ativação de vias de citoaderência das células infectadas (HANSEN; SCHOFIELD, 2010).

Os níveis de citocinas e interleucinas variam de acordo com a manifestação malárica. Estudos mostram que altos níveis de INF- γ estão relacionados com o agravamento da doença, mesmo sabendo-se que ele é um elemento essencial para o controle inicial da malária (GOOD; DOOLAN, 1999; ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; ANDRADE et al. 2010). O TNF- α está relacionado com a mortalidade do parasita, diminuição das taxas de reinfecção, mas não se sabe ainda qual o papel efetivo na patogênese da malária, uma vez que o próprio TNF- α também estimula a produção de outros mediadores como IFN- γ , IL-1, IL-6 (KREMSNER et al., 1995; MORDMULLER et al., 1997).

A interleucina 2 (IL-2) é um produto das células CD4⁺, responsável pela estimulação

de citotoxicidade em células T citotóxicas e NK, mas seu real papel no processo inflamatório induzido pela malária ainda é alvo de estudos. A interleucina 4 (IL-4) desempenha um papel regulatório na infecção através da inibição da resposta Th1 e também pode estar envolvida na aquisição de memória na resposta imune (MORROT et al., 2005 SHIBUI et al., 2009). Estudos com camundongos sensíveis à malária cerebral através da avaliação de expressão gênica demonstraram que a supressão de IL-4 leva ao desenvolvimento da malária cerebral, desta forma, pode-se afirmar que altos níveis de IL-4 são protetivos ao desenvolvimento da malária cerebral. Porém em humanos, estudos realizados por Cabantous et al. (2009) demonstram o inverso, onde altos níveis de IL-4 estão relacionados com malária grave e anemia severa, em crianças.

A interleucina 10 (IL-10) na malária, apresenta uma resposta protetora à reinfeção (ROBINSON et al., 2009), não apresentando diferentes níveis de secreção na forma grave da doença, porém baixas concentrações de IL-10 estão relacionadas à anemia grave (AWANDARE et al., 2006; LANGHORNE et al., 2008).

O TGF- β , uma citocina anti-inflamatória, tem uma resposta imune excessiva frente a infecção malárica, onde ela reduz a produção da enzima óxido sintase induzível (iNOS). Estudos com modelos murinos demonstraram que a regulação das células efectoras Th1 por IL-10 e TGF- β são essenciais para o controle imunopatológico (LUCKHART et al., 2008).

O equilíbrio entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias parece ser crucial na determinação da gravidade dos sintomas clínicos, no grau de parasitemia e ainda na eliminação da doença (WIPASA et al., 2002; ROBINSON et al., 2009).

1.5 DROGAS ANTIMALÁRICAS

Fármacos antimaláricos começaram a ser produzidos na década de 40, a partir de extratos naturais ou ainda produtos sintéticos. Cada fármaco apresenta uma especificidade para cada fase do ciclo biológico do plasmódio: fármacos eritrocitos, fármacos gametocíticos e os fármacos esporontocidas (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Um dos grupos de fármacos utilizados até hoje é a família da quimina e seus derivados, cuja foi isolada em 1820 por Pelletier e Caventou a partir da casca da *Cinchona*. A *Cinchona* (Rubiaceae) já era utilizada pelos indígenas que foram catequizados pelos jesuítas para alguns tipos de febre, e na primeira expedição de volta a Europa, em meados de 1639, os jesuítas levaram cascas de *Cinchonae* também a utilizavam como antitérmico (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006; OLIVEIRA; SZCERBOWSKI, 2009). Um dos fármacos derivados da quinina é a cloroquina, que se mostrou mais eficaz e menos tóxica, porém o *Plasmodium falciparum* já se mostrou resistente à ela. O mecanismo de atuação da quinina ocorre na fase esquizotocida eritrocítica, com ação rápida sobre os *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malarie*, não agindo sobre os esquizontes tissulares do *P. falciparum*. Outros derivados da quinina também apresentam eficácia, mas também grande toxicidade hepática que resultam

em epigastria, vômitos e náuseas, além da hipoglicemia (GOMES et al., 2011).

Algumas espécies do gênero *Artemisia annua*, uma planta da medicina chinesa que tem grande eficiência sobre o *P. falciparum*, reduzindo sua parasitemia e evitando com que o quadro se agrave (RODRIGUES et al., 2006). Os derivados da Artemisinina, como o Artesunato e o Artemeter, tem ação rápida sobre os esquizontes eritrocitários, sendo então os fármacos de primeira escolha, tanto nas infecções provocadas pelo *P. falciparum* quanto pelo *P. vivax* (GOMES et al., 2011).

O tratamento farmacológico na malária, preconizado pelo protocolo do Ministério da Saúde, tem como objetivo a interrupção da proliferação do parasito, e a destruição de formas latentes (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias, além da interrupção da transmissão pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas do plasmódio (SILVA et al., 2003; BRASÍLIA, 2010a).

1.5.1 Mecanismo de ação dos antimaláricos

Para sobrevivência do parasita no hospedeiro vertebrado, este promove várias adaptações aos susceptíveis ataques terapêuticos. Desta forma os fármacos em uso clínico atuam em diferentes etapas do ciclo de vida do parasita, onde grande parte dos fármacos age inibindo a produção de hemozoína ou a síntese do ácido fólico.

1.5.1.1 Inibidores da produção de hemozoína

Os inibidores de hemozoína agem se ligando ao grupo heme ou ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX) resultante da degradação da hemoglobina pelo parasita. A ferriprotoporfirina IX é tóxica ao parasita, pois tem capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio. Para evitar a toxicidade ao parasita, ele libera um pigmento cristalino chamado hemozoína e o agrega ao (Fe (III) PPIX) tornando-o não tóxico (CUNICO et al., 2008).

1.5.1.2 Inibidores de ácido fólico

O Ácido fólico é um componente importante para o metabolismo do parasita, cujo é capaz de sintetizá-lo através dos Ácidos p-aminobenzícos (PABA) e atuação da enzima diidropteroato sintase. A primeira forma de inibição ocorre pelos análogos estruturais dos PABA, como a Dapsona e a Sulfadoxina. Uma segunda forma de inibição ocorre pela inibição da enzima diidrofolato redutase, onde atuam o Cicloproguanil, o Proguanil e o Cloroproguanil (CUNICO et al., 2008).

1.5.1.3 Inibidores da transcrição procariótica

Os antibióticos inibidores de transcrição procariótica apresentam eficácia sobre os parasitas da malária, reduzindo significativamente a taxa de parasitemia. Porém a inibição só é observada após o segundo ciclo de reprodução (CUNICO et al., 2008).

1.5.1.4 Inibidores do transporte de elétrons mitocondrial

O plasmódio utiliza a glicose para produzir ATP, pois reside em meios com deficiência de oxigênio. Sendo assim, a mitocôndria não tem uma atividade de fosforilação oxidativa e acaba por ter uma cadeia de transporte de elétrons incompleta, o que leva a reações de redox. A Ubiquinona é a proteína mitocondrial do parasita que atua no transporte de elétrons e a Atovaquona é estruturalmente análogo à Ubiquinona, e essa competição age inibindo a reprodução do parasita (CUNICO et al., 2008)

1.6 BUSCA DE PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTIMALÁRICA

Apesar da efetividade das terapias convencionais da malária, é necessária a busca por novos produtos que possam reduzir a parasitemia da malária e consequentemente impedir principalmente as lesões hepáticas e renais resultando em uma melhora clínica rápida e efetiva do paciente reduzindo assim a mortalidade nestes casos.

Muitas plantas são utilizadas com finalidade terapêutica pela medicina tradicional e alternativa, inclusive para o uso em doenças infecciosas. A maior parte da Floresta Amazônica fica em território brasileiro, disponibilizando uma gama de plantas a serem utilizadas com finalidade antimalárica (MACIEL et al., 2002).

Uma das plantas com finalidade medicinal mais utilizada é a copaíba, que se distribui por toda a América Latina e a África Ocidental (SACHETTI et al., 2009). As regiões brasileiras onde são encontradas facilmente a copaíba ou copaibeiras são a Amazônia e Centro-Oeste.

1.6.1 O GÊNERO *Copaifera*

O gênero *Copaifera* L. pertence a família *Leguminosae* e sub-família *Caesalpinoideae* (PIERI et al., 2009). Dentre as espécies presentes e mais abundantes na América Latina estão a *Copaifera officinalis* L., encontrada no norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador, *Copaifera guianensis* Desf., nas Guianas, *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, encontradas em toda a Amazônia, *Copaifera confertiflora* Bth, no Piauí, *Copaifera langsdorffii* Desf., encontrada no Brasil, Argentina e Paraguai, a *Copaifera coriacea* Mart., na Bahia e ainda a *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke, encontrada no Ceará (VEIGA JR E PINTO, 2002; PIERI et al., 2009).

A espécie *C. langsdorffii* Desf. tem distribuição da Amazônia até o estado de Santa Catarina, sendo encontrada em 4 diferentes variedades: *C. langsdorffii* var. *grandifolia*, *C. langsdorffii grandifolia*, *C. langsdorffii laxa* e *C. langsdorffii glabra* (VEIGA JR E PINTO, 2002).

As copaibeiras podem chegar até 40 metros de altura, com tempo de vida estimado em 400 anos. Seu tronco é áspero e escuro (VEIGA JR E PINTO, 2002) e contradiz com dados informados por Mendonça e Onofre (2009) quando dizem que seu tronco é liso;

quanto à altura também há divergências, pois Veiga JR e Pinto (2002) e ainda Pieri et al. (2009) se referem a uma altura máxima de 40 metros e com diâmetro de 4 metros enquanto Mendonça e Onofre (2009) se referem a uma altura máxima de 36 metros. Os frutos têm aspecto ovóide com sementes pretas (PIERI et al., 2009), suas flores são pequenas e suas folhas se alternam entre pecioladas e penuladas (VEIGA JR E PINTO, 2002).

De acordo com Muniz et al. (2010), os biomas do Cerrado e da Amazônia tem 28 espécies catalogadas, sendo 16 endêmicas do Brasil. A partir dos 5 anos de idade, as copaibeiras começam a florir e frutificar. De acordo com Veiga Jr. e Pinto (2002), a floração ocorre entre outubro e julho e a frutificação de junho até outubro, com variação do período dependendo do clima e da região em que se encontra. Mendonça e Onofre (2009), em sua pesquisa relatam que a floração ocorre entre janeiro e março, com frutificação entre março e agosto, o que reafirma que o clima e a região tem interferência sobre estas.

A casca da copaibeira exala um aroma marcante, porém o que se utiliza da planta é seu oleorresina, que fica armazenado no interior do tronco, e tem alta demanda para o mercado de fitofármacos e alguma demanda para área cosmética (VEIGA JR E PINTO, 2002).

A copaíba e suas propriedades medicinais são conhecidas desde o século XVI, onde os índios a utilizavam para curar suas feridas após as batalhas (VEIGA JR E PINTO, 2002; PIERI et al., 2009).

1.6.2 Caracterização do oleorresina de *Copaifera reticulata*

É um composto que mistura sesquiterpenos e diterpenos, onde os sesquiterpenos são responsáveis pela composição volátil do óleo e que conferem um agradável aroma e também apresentam atividade anti-inflamatória (SILVA et al., 2012). Os diterpenos compõem a parte sólida resinosa e não volátil do oleorresina, responsável por compor 55 a 60% do óleo (PIERI et al., 2009).

Mesmo apresentando diferença na quantidade de sesquiterpenos e diterpenos em cada espécie, somente estes grupos podem estar presentes no oleorresina puro. Os principais sesquiterpenos encontrados no oleorresina de copaíba são: β -cariofileno, sendo o sesquiterpeno predominante, com ação anti-inflamatória, antibactericida, antifúngica e antiedêmica; β -bisaboleno, com ação anti-inflamatória e analgésica; α -humuleno, α e β -selineno, α -bisabolol, β -elemeno, γ -cadineno, α -cadinol, entre outros (VEIGA JR E PINTO, 2002; PIERI et al., 2009).

O principal sesquiterpeno da *Copaifera reticulata*, o β -Cariofileno, além das atividades anti-inflamatórias, anestésicas, antimicrobianas e anti-oxidativas já citadas, também apresenta atividade antiparasitária contra a *L. amazonensis* (CASON e GILBERT, 2000; GHELARDINI et al., 2001; LIMA et al., 2003; VEIGA JUNIOR et al., 2007; SANTOS et al., 2008 c).

Entre as características físico-químicas, a baixa viscosidade e a acidez tem importância para a indústria farmacêutica, enquanto a alta viscosidade e acidez são importantes para produção de sabonetes, xampus e condicionadores, que remetem ao processamento cosmético (VEIGA JR e PINTO, 2002).

1.6.3 Propriedades medicinais do oleorresina do gênero *Copaifera*

O oleorresina de copaíba é utilizado pela medicina tradicional para inúmeras finalidades, sejam elas curativas e/ou paliativas. Suas propriedades medicinais foram analisadas e testadas por diversos pesquisadores, que ora encontraram propriedades antes não relatadas, ora confirmaram a ação já relatada, com diferentes modelos experimentais. A tabela 1 mostra parte dos pesquisadores que tem como o foco de estudo o gênero *copaifera* L e as propriedades encontradas por cada um destes.

AUTORES	PROPRIEDADE MEDICINAL
BARBOSA-NETO et al., 2006	Atividade larvicida
SANTOS et al., 2013	Atividade antileishmania
DORNELES et al., 2013	Atividade antiparasitária
GERIS et al., 2008	Potencial larvicida
SANTOS et al., 2008	Atividade antimicrobiana
DEUS et al., 2011	Atividade antifúngica
PIERI et al., 2010	Atividade antimicrobiana e antibacteriana
PIERI et al., 2012	Atividade bacteriostática
SILVA et al., 2012	Atividade diurética, anti-inflamatória, cicatrizante e antitumoral
MENDONÇA e ONOFRE, 2009	Atividade antimicrobiana
VEIGA JR e PINTO, 2002	Atividade antiviral, analgésica, antiparasitária, insetífuga, antitumoral, cicatrizante, potencial antisséptico e antibacteriana
TRINDADE et al., 2013	Atividade larvicida
VASCONCELOS et al., 2008	Atividade antibacteriana

Tabela 1. Relação de autores que pesquisaram sobre o gênero *Copaifera* L. e as propriedades medicinais identificadas por estes.

Saber a espécie é de extrema importância, pois cada árvore de copaíba fornece um oleorresina com diferença entre o percentual de compostos, o que interfere diretamente aos efeitos benéficos e/ou tóxicos. Algumas espécies são mais citadas na literatura, como se pode observar na tabela 2.

ESPÉCIE	PROPRIEDADE MEDICINAL
<i>C. langsdorfii</i>	Atividade larvívica (BARBOSA-NETO et al., 2006 e GERIS et al., 2008).
<i>C. multijuga</i> Hayne	Atividade larvívica (TRINDADE et al., 2013), atividade antimicrobiana (MENDONÇA e ONOFRE, 2009; SANTOS et al., 2008 e VASCONCELOS et al., 2008), atividade antifúngica (DEUS et al., 2011).
<i>C. officinalis</i>	Atividade antimicrobiana (PIERI et al., 2010), atividade bacteriostática (PIERI et al., 2012).
<i>C. reticulata</i>	Atividade antileishmaniose (SANTOS et al., 2013), atividade antiparasitária (DORNELES et al., 2013), atividade anti-inflamatória (MUNIZ et al., 2010).
<i>C. duckey</i>	Atividade antiparasitária (DORNELES et al., 2013).
<i>C. Martii</i>	Atividade antimicrobiana (SANTOS et al., 2008).
<i>C. cearenses</i>	Atividade antimicrobiana (SANTOS et al., 2008).
<i>C. paupera</i>	Atividade antimicrobiana (SANTOS et al., 2008).

Tabela 2. Relação entre espécie da copaibeira e a propriedade medicinal identificada em experimentos.

Em estudo realizado por Veiga Jr et al. (2005), a ação antiparasitária foi confirmada pelas espécies *C. reticulata* e *C. multijuga*, com eficácia de 87% e 100% respectivamente.

1.7 UTILIZAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS EM MALÁRIA

A análise da atividade antimalárica de novos compostos segue procedimentos padronizados, onde primatas já serviram de modelos experimentais para a malária causada pelo *P. falciparum*, pois reproduz parâmetros muito semelhantes à infecção pelo *P. falciparum* em humanos. Atualmente, devido as razões econômicas e éticas, os estudos experimentais *in vivo* têm-se baseado em diferentes roedores (modelo murino) e plasmódios de roedores, cujas diferenças biológicas entre as espécies de parasitas devem ser levadas em consideração.

Os modelos murinos de malária têm sido muito utilizados e fornecem uma importante ferramenta para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na proteção do hospedeiro e na patogênese da doença (LAMB et al., 2006). Algumas diferenças entre os modelos humanos e murinos, como esperado, são observadas. Em camundongos, os mecanismos de ação de IL1 β , TNF α e IL6 são muito similares aos de seres humanos. Estas citocinas atuam no SNC e no centro de termorregulação no hipotálamo, onde assim como na sepsis em humanos, a sepsis murina tem como resultado a hipotermia ao invés de febre. Na malária murina as citocinas pró-inflamatórias também desempenham um importante papel na patogenia da infecção (SOUZA e RILEY, 2002; LAMB et al. 2006).

A imunidade inata é um das primeiras barreiras que o organismo possui para detectar a presença de patógenos invasores e rapidamente eliminá-los ou iniciar uma resposta imune adaptativa protetora. Na malária, já foi demonstrado que a imunidade inata

do hospedeiro é ativada ainda nas fases iniciais da infecção e que a sobrevivência do hospedeiro, principalmente no caso da malária murina, está ligada a capacidade do animal em controlar a parasitemia nos primeiros 7 – 14 dias de infecção (STEVENSON et al. 2004).

Existem quatro espécies de parasitas de malária extraídos de roedores africanos que foram adaptadas para o crescimento em camundongos: *P. berghei*; *P. chabaudi*; *P. vinckei*; e *P. yoelii*. Cada uma das espécies de malária de roedores apresenta características similares às quatro espécies de malária humana, propiciando deste modo a escolha do plasmódio de roedores de acordo com o tipo de estudo. Para estudos de variação antigênica é utilizado com mais frequência o *P. chabaudi*, testes para novas drogas utilizam o *P. berghei* ou *P. chabaudi*, para estudos das complicações que a malária cerebral causa são utilizadas cepas de *P. berghei* ANKA, para testes de vacinas em estágio pré-eritrocíticos é utilizado o *P. yoelii* e para estudos de cronobiologia é utilizado o *P. vinckei*. Estes modelos de parasitas tornaram-se amplamente utilizados especialmente devido à facilidade de manuseio e de criação de ratos e camundongos em laboratório (LI et al., 2001).

Dentre os roedores utilizados para estudos maláricos, os mais indicados são os camundongos, e cada linhagem apresenta características similares e diferentes ao mesmo tempo quando infectadas por algum plasmódio. As linhagens mais utilizadas são a *Swiss*, que é utilizada como modelo de estudo diversos, como por exemplo, o entendimento de doenças metabólicas, auto-imunes, fixação de complemento, tumores de mama e pulmão, além de testes de drogas e também de comportamento; a linhagem BALB/c tem sua maior utilização na produção de anticorpos monoclonais, também apresentam baixa incidência de cistos ovarianos e de tumores mamário, porém desenvolvem com facilidade ao longo da vida outros tipos de cânceres, são resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose, apresentam alta incidência de calcificação cardíaca, distúrbios cardiovasculares e lesões do miocárdio, além da grande sensibilidade à radiação X; a linhagem C57BL/6 apresenta a pelagem negra (camundongo BLACK) e é amplamente empregada em estudos in vivo nas áreas de biologia cardiovascular e do desenvolvimento e comportamento, diabetes e obesidade, genético, imunologia, neurobiologia e oncologia, são altamente susceptíveis à obesidade, diabetes tipo 2 e aterosclerose induzida por dieta, alta incidência de microftalmia e outras alterações oculares, dermatite crônica ulcerativa, e diferentemente das duas outras linhagens citadas, esta apresenta alta preferência ao álcool (LI et al., 2001; QUEIROZ, 2007; HONG et al., 2011).

A inoculação de determinada cepa de plasmódio em um roedor pode apresentar diferentes reações. Quando um camundongo da linhagem C57BL/6 é infectado pelo *P. berghei* ANKA, ele apresenta alterações neurológicas, ataxia, paralisia muscular, convulsões, como e morte, similarmente observadas em humanos. Apresenta alterações metabólicas e vasculares sistêmicas e alterações na massa encefálica, quadro também apresentado em humanos (QUEIROZ, 2007). A inoculação desta mesma cepa de *P. berghei* ANKA em camundongos BALB/c não é capaz de desenvolver a síndrome

neurológica, apesar de apresentar alterações na massa encefálica, o tempo de sobrevivência é maior (aproximadamente 04 semanas) e apresenta um quadro de anemia grave e alta parasitemia, que o leva ao óbito.

Embora nenhum modelo animal reproduza com exatidão a síndrome humana, o *P. berghei* ANKA causa em linhagens não resistentes de camundongos (C57BL/6 e CBA), um quadro neuroclínico com sinais de ataxia, convulsões e como associados ao sequestro celular nos vasos da microcirculação, pois somente estas duas linhagens apresentam predisposição genética em expressar uma intensa resposta imune pró-inflamatória (SOUZA e RILEY, 2002). Outras cepas de *P. berghei* são a NK65 e K173.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AQUISIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO OLEORRESINA DE *COPAIFERA RETICULATA*

O óleo-resina de *Copaifera reticulata* utilizado nos testes foi cedido pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Oeste do Pará e foi coletado na Floresta Nacional do Tapajós - FLONA, no quilômetro 67, localizada no município de Belterra. A exsiccata da planta está depositada no herbário da Embrapa oriental, sobre o número de registro – NID: 69/2011. A extração foi realizada em período seco e a metodologia foi a mesma descrita em Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006). A caracterização foi realizada através do método de Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e por Cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS). As substâncias majoritárias presentes são os sesquiterpenos β -Cariofileno e o β -Bisaboleno, que apresentaram 41.67% e 18.62%, respectivamente (BALDISSERA et al., 2014).

2.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c provenientes do Biotério da Universidade de Campinas - UNICAMP, com 4 semanas de nascidos. Os animais foram mantidos no alojamento de animais do Laboratório de Farmacologia/ISCO/UFOPA, a uma temperatura controlada de 22 ± 2 °C, com um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração balanceada (Labina®) e água *ad libitum*, durante 15 dias, para adaptação do alojamento e posterior a este período os animais foram separados em grupos experimentais. Citar sobre a autorização da CEUA e mostrar número de protocolo.

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Federal do Oeste do Pará sob protocolo 02001/2015.

2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

O teste de toxicidade aguda, segundo as diretrizes da The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) OCDE-423/2001 (OECD, 2001), que consiste em ensaios para a classificação de toxicidade de substâncias em teste utilizando camundongos ou ratos, preferencialmente fêmeas devido sua maior sensibilidade em relação aos machos. O protocolo estabelece que o teste se inicie com três animais, e que se até um (1) animal vier ao óbito, o teste deverá ser repetido, porém se dois (2) ou três (3) animais forem ao óbito, o teste deverá ser interrompido, e a dose será considerada tóxica. O método é capaz de classificar as substâncias, semelhantes a outros métodos, como o método que estabelece a DL-50, e se baseia na avaliação biométrica com doses fixas para a classificação e riscos no qual o indivíduo será submetido ao receber a substância em estudo.

Esta metodologia consiste na administração por sonda gástrica utilizando um tubo estomacal o óleo-resina da *Copaifera reticulata* diluído em Tween 80 à 4% e veiculado em PBS, em uma dose inicial única de 2000 mg/kg de massa do animal, inicialmente em grupo de 3 indivíduos, e dependendo dos efeitos adversos e da quantidade de indivíduos que apresentar tais efeitos, será determinado a continuidade dos experimentos.

Segundo o protocolo OCDE-423/2001, quando há estudos com informações sobre doses com possíveis efeitos tóxicos, os protocolos podem ser seguidos a partir da dose máxima sem efeito colateral. Desta forma, considerando que Sachetti et al. (2009) comprovou que a dose de 2000 mg/Kg de peso corporal da *C. reticulata* não produz danos em roedores. Seguindo recomendação do protocolo OCDE-423/2001, como há trabalhos científicos que nos dão informação onde sugerem que a mortalidade é improvável no mais alto nível da dose inicial, então será utilizado a dose de 2000 mg/kg pc. Quando não existe qualquer informação sobre a substância a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se usar a dose inicial de 300 mg/kg de peso corporal. Após a administração da dose do óleo-resina, os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez a cada 30 minutos nas quatro primeiras horas, periodicamente durante as primeiras 24 horas, e diariamente a partir de então até um total de 14 dias. Os parâmetros que foram observados, com possíveis reações tóxicas, foram alterações na pele, pêlos, olhos e mucosas, sinais de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono, coma, dor e sofrimento, além do tempo de início e duração do período de recuperação.

2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado o tratamento com óleo-resina da *C. reticulata* em 3 doses diferentes definidas de acordo com o teste de toxicidade aguda estabelecido por Sachetti et al. (2009), que apontou que a dose de 2000 mg/kg de *C. reticulata* não apresentou mortalidade ou morbidades em roedores, sendo de relativa margem de segurança para utilização como agente terapêutico. Sendo assim, as doses deste estudo correspondem a 1/4, 1/20 e 1/200 da dose máxima tolerada. Para avaliação da atividade antimalárica, foi utilizado ainda a Artemisinina (100mg/kg).

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais. Primeiro grupo: Grupo Controle, os animais não foram infectados, mas receberam estímulo de tratamento com veículo, o PBS (Solução tampão Fosfato Salino). Este grupo serviu como parâmetro normal de referência para as análises hematológicas e bioquímicas realizadas.

No segundo grupo, o Grupo Malária, os animais foram infectados com o *P. berghei*. Estes animais receberam somente o estímulo de tratamento com veículo PBS. Este grupo serviu para análise das alterações que a malária pode provocar em animais infectados sem tratamento.

No terceiro grupo, o Grupo Artemisinina, os animais foram infectados com o *P. berghei*

e receberam o tratamento com a Artemisinina 100 mg/kg/dia por via oral. A Artemisinina é uma das drogas utilizadas no tratamento da malária em humanos e este grupo serviu de comparativo com os grupos de tratamento com o oleorresina de *C. reticulata*.

O quarto, quinto e sexto grupo, os animais foram infectados com o *P. berghei* e foram tratados com as respectivas doses de *C. reticulata*: Grupo *C. reticulata* 200 mg/Kg/dia, Grupo *C. reticulata* 100 mg/Kg/dia e Grupo *C. reticulata* 10 mg/Kg/dia.

O oleorresina foi solubilizado em Tween 80 à 4% e veiculado em PBS, administrados por via oral.

A droga padrão Artemisinina com 98% de pureza, uma quantidade de 100 mg, foi adquirida da Empresa Sigma Aldrich®, localizada em Saint Louis, USA.

Todos os tratamentos foram iniciados no 4º dia após a inoculação do plasmódio, neste dia foi realizada a primeira verificação da densidade parasitária para confirmação da infecção.

2.5 MANUTENÇÃO DA CEPA DE *PLASMODIUM BERGHEI*

Inicialmente foi retirada de uma fêmea infectada, uma amostra de sangue da porção terminal da cauda. Uma alíquota de 20 µL de sangue total foi diluída em solução de PBS, para um volume final de 1000 µL. Desta solução, 100 µL foram administrados por via intraperitoneal nos animais de repasse, sendo este procedimento repetido semanalmente para a infecção de novos animais e garantia de manutenção *in vivo* da cepa.

2.6 INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Para induzir o modelo de malária, foi utilizada a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Uma amostra da cepa foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Fâni Dolabela, do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Pará.

Para a inoculação dos grupos experimentais, o animal infectado primariamente e doador, teve coletado uma gota da porção terminal da cauda para análise da densidade parasitária. Os animais que apresentaram uma densidade maior que 10% na fase de ascensão tiveram o conteúdo sanguíneo coletado através da punção cardíaca.

A coleta por punção cardíaca foi realizada com o auxílio de seringa de insulina lavada com EDTA, sendo o agente anticoagulante. Para garantir o grau de parasitemia uniforme nos diferentes grupos experimentais, os animais foram infectados por via intraperitoneal com o inóculo padronizado de aproximadamente 10^6 eritrócitos parasitados em 100 µL de PBS.

2.7 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA E SUPRESSÃO PARASITÊMICA

Para a determinação da parasitemia, foram realizadas as pesquisas de parasitas através de distenções com o sangue obtido da cauda dos camundongos fixado em metanol absoluto (P.A.) durante 2 minutos e posteriormente corado com solução de Giemsa (10%) por 15 minutos.

A porcentagem de parasitemia de cada animal foi determinada pela razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e quantidade total de células (500 células por esfregaço).

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de eritrócitos parasitados}}{500}$$

A determinação da parasitemia se deu no 4º, 7º e 11º dias pós inoculação dos camundongos BALB/c com a cepa PbA.

Para determinar a potencial supressão do oleorresina sobre o índice de parasitemia nos camundongos infectados com *P. berghei*, seguiu-se o modelo de cálculo proposto por Girma et al. (2015), onde:

$$\% \text{ supressão} = \frac{\text{parasitemia do controle negativo} - \text{parasitemia do grupo tratado}}{\text{parasitemia do controle negativo}} \times 100$$

2.8 ANÁLISE DE SOBREVÍDUA PÓS TRATAMENTO COM OLEORRESINA DE *C. RETICULATA*

Em cada grupo experimental foram escolhidos aleatoriamente dois animais para análise de sobrevivência após a inoculação do plasmódio e tratamento com a *C. reticulata*. Os animais foram mantidos a uma temperatura controlada de 22±2 °C, sobre um ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração balanceada (Labina®) e água *ad libitum*, até o óbito naturalmente.

2.9 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA

A determinação da concentração de glicose no plasma foi realizada, através do método enzimático-colorimétrico da glicose-oxidase usando kit LabTest®, com leitura realizada em Analisador Bioquímico semi-automático Thermoplat®. Os resultados foram expressos em mg/dL.

2.10 PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

Ao final do período de tratamento os animais foram submetidos avaliação dos parâmetros de função hepática, com análise da atividade das enzimas Alanina Aminotransferase (AST), Aspartato Aminotransferase (ALT) e dosagem da Bilirrubina Total, Direta e Indireta.

2.10.1 Determinação da atividade da Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)

A atividade das transaminases foi determinada através do plasma utilizando kit LabTest® por método cinético-colorimétrico, com leitura realizada no Analisador Bioquímico semi-automático Thermoplat®. Os resultados foram expressos como U/L.

2.10.2 Análise da concentração de Bilirrubina Total, Direta e Indireta

A análise da concentração de Bilirrubina Total, Direta e Indireta foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico, com kit LabTest®, com leitura realizada em Analisador Bioquímico semi-automático Thermoplat®. Os resultados da Bilirrubina foram expressos em mg/dL.

2.10.3 Avaliação da atividade da Enzima Fosfatase Alcalina

A avaliação da atividade da Enzima Fosfatase Alcalina foi pelo método cinético-colorimétrico, com kit LabTest®, sendo que a leitura foi realizada em Analisador Bioquímico semi-automático Thermoplat®. O resultado foi expresso em U/L.

2.11 PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL

O sangue coletado ao final do tratamento foi utilizado para determinar os níveis de Creatinina Plasmática e os níveis de Uréia Plasmática.

2.11.1 Determinação dos níveis plasmáticos de Creatinina e Uréia

A determinação dos níveis plasmáticos de Creatinina e Uréia foi pelo método enzimático-colorimétrico, com kit LabTest®, com leitura realizada em Analisador Bioquímico semi-automático Thermoplat® os resultados foram expressos em mg/dL e U/L respectivamente.

2.12 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para análise hematológica foi realizado um hemograma ao final do tratamento onde foram avaliados os seguintes parâmetros da série vermelha: Contagem Total de Eritrócitos,

Quantificação de Hemoglobina, Determinação do Hematócrito, a Concentração de Hemoglobina Média (HCM), a Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e também a contagem total de plaquetas; e da série branca: Número absoluto de Leucócitos, Quantitativo de Linfócitos e Monócitos e o Quantitativo de Neutrófilos (Segmentados).

Para realização do hemograma foi utilizado um Analisador Hematológico Mindray, modelo BC2800 veterinário.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados e analisados estatisticamente através do programa Graph Pad Software, San Diego, CA Prism 5.0®. Os resultados foram expressos de modo quantitativo e submetidos aos testes estatísticos ANOVA seguido do teste Tukey, sendo a probabilidade aceita como indicativa da existência de diferença significativa foi de $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$.

RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

A administração da dose máxima de oleorresina de *Copaifera reticulata* de 2000 mg/kg, não promoveu alterações como perda de pêlos ou na coloração dos mesmos, tremores, aumento de salivação, diarreia, letargia, aumento ou diminuição do sono, sinais de dor ou sofrimento, além de diminuição de peso, como pode ser observado na tabela 3, quando os animais teste foram comparados aos animais do grupo controle.

	Teste 1		Teste 2	
Dia	Controle	2000mg/Kg	Controle	2000mg/Kg
0	19,83±2,00	20,63±1,06	21,57±1,24	22,3±0,70
	n=3	n=3	n=3	n=3
7	20,02±1,91	21,01±1,86	22,39±1,33	22,83±0,96
	n=3	n=3	n=3	n=3
14	21,95±1,63	21,87±1,28	22,56±1,41	23,35±1,15
	n=3	n=3	n=3	n=3

Tabela 3: Media do peso corporal (Gramas ± Desvio Padrão) de camundongos BALB/c expostos oralmente ao veículo (PBS) de diluição e ao óleorresina de *C. reticulata* na dose de 2000 mg/Kg. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo teste, em ambas as repetições (ANOVA, seguido do teste Tukey).

4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EVOLUÇÃO DA PARASITEMIA E DOS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PLASMÁTICA

A análise quantitativa do número de parasitas nas amostras sanguíneas coletadas no 11º dia pós-inoculação do sangue parasitado demonstrou que houve uma diferença significativa com $p<0,001$ no percentual médio de parasitas entre o grupo Malária (11,65±1,03) quando comparado aos grupos tratados com Artemisinina 100 mg (0,54±0,14) e *C. reticulata* 200 mg (0,50±0,08), *C. reticulata* 100 mg (0,77±0,37) e *C. reticulata* 10 mg (1,28±0,34). Os resultados estão apresentados no Gráfico 01 e demonstram que todos os grupos tratados apresentaram uma redução na parasitemia sanguínea quando comparados ao grupo Malária.

A supressão da parasitemia nos grupos tratados com a *C. reticulata* nas doses de 200 mg, 100 mg e 10 mg foi de 95,70%, 93,39%, 10,98%, respectivamente. O tratamento com a Artemisinina 100 mg promoveu uma supressão de 95,36%.

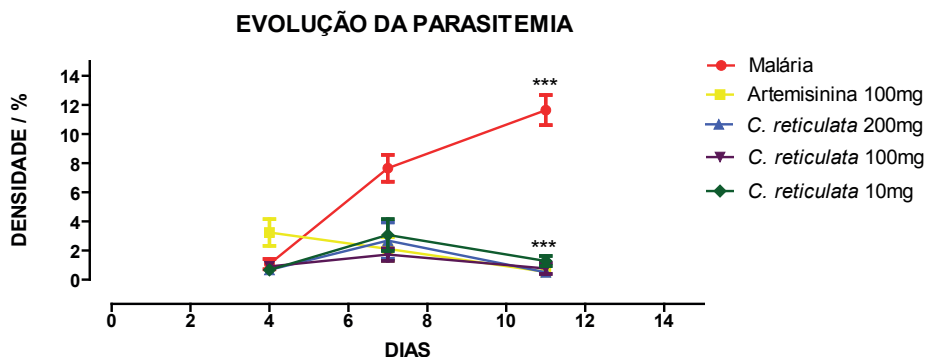


Gráfico 01. EVOLUÇÃO DA PARASITEMIA. Cada ponto representa média $\pm$ e.p.m. da densidade parasitária dos animais dos grupos Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ***Representa que houve uma diferença significativa na densidade parasitária do grupo Malária quando comparada aos grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg (ANOVA, seguido de teste Tukey).

A avaliação realizada da concentração plasmática de glicose demonstrou que houve uma redução significativa com $p < 0,001$ nos níveis glicêmicos dos animais do grupo Malária ($71,86 \pm 9,04$ mg/dL) quando comparados ao grupo Controle ($218,1 \pm 4,87$ mg/dL). Quando realizamos a comparação entre o grupo Malária *versus* os grupos tratados com Artemisinina 100 mg ($194,9 \pm 9,49$ mg/dL), *C. reticulata* 200 mg ($148,3 \pm 8,48$ mg/dL), *C. reticulata* 100 mg ($121,3 \pm 13,1$ mg/dL) e *C. reticulata* 10 mg ($153,9 \pm 12,96$ mg/dL) percebemos que houve um aumento significativo com $p < 0,05$ nos níveis glicêmicos. (Gráfico 02).

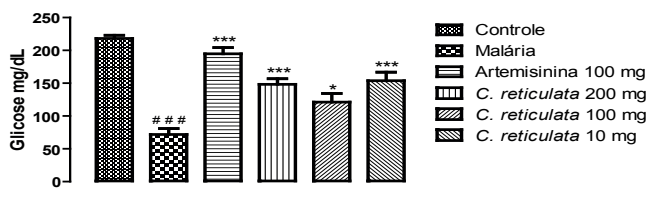


Gráfico 02. NÍVEL DE GLICOSE PLASMÁTICA. Cada barra representa média $\pm$ e.p.m. dos níveis de glicemia plasmática dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) na glicemia nos animais do grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. * Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na glicemia dos animais do grupo *C. reticulata* 100 mg quando comparados com o grupo Malária; *** Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) na glicemia dos animais dos grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg e *C. reticulata* 10 mg quando comparados com o grupo Malária (ANOVA, seguido de teste Tukey).

4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

A análise da atividade da enzima Aspartato Aminotransferase (AST) demonstrou que não houve diferença significativa ($p>0,05$) no grupo Malária (51,71±1,10 U/L) quando comparado ao grupo de animais Controle (57,71±0,80 U/L). Porém, quando comparamos o grupo Malária com aos grupos tratados, com Artemisinina 100 mg (46,22±3,17 U/L), *C. reticulata* 200 mg (50,63±2,75 U/L), *C. reticulata* 100 mg (47,57±2,64 U/L) e *C. reticulata* 10 mg (43,00±2,60 U/L), observamos que houve uma redução significativa ($p<0,05$) na atividade da enzima AST nos grupos tratados.

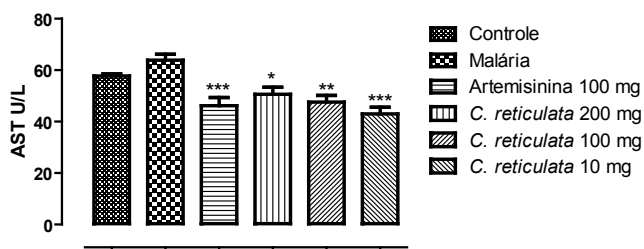


Gráfico 03. ATIVIDADE DA ENZIMA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST). Cada barra representa média ± e.p.m. da atividade da AST dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. * Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,05$) na atividade da enzima AST nos animais do grupo *C. reticulata* 200 mg quando comparados ao grupo Malária. ** Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,01$) na atividade da enzima AST nos animais do grupo *C. reticulata* 100 mg quando comparados ao grupo Malária. ***Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) na atividade da enzima AST nos animais do grupo Artemisinina 100 mg e *C. reticulata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido de teste Tukey).

A análise da atividade da enzima Alanina Aminotransferase (ALT) demonstrou que houve diferença significativa ($p<0,01$) na atividade da ALT nos animais do grupo Malária (49,75±1,37 U/L) quando comparados ao grupo Controle (41,25±0,94 U/L). Quando analisamos os resultados obtidos nos grupos tratados com Artemisinina 100 mg (30,88±1,67 U/L), *C. reticulata* 200 mg (42,13±0,39 U/L) e *C. reticulata* 100 mg (36,63±1,87 U/L), observamos uma redução significativa ($p<0,01$) na atividade da enzima ALT, quando comparados ao grupo Malária. O grupo *C. reticulata* 10 mg (42,25±1,78 U/L) não reduziu significativamente os níveis da atividade da enzima ALT (Gráfico 04).

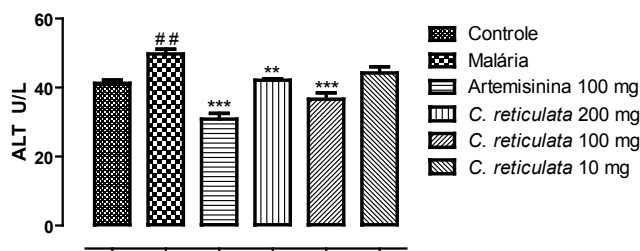


Gráfico 04. ATIVIDADE DA ENZIMA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT). Cada barra representa média $\pm$ e.p.m. da atividade da ALT dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ## Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,01$) na atividade da enzima ALT nos animais do grupo Malária quando comparados aos animais do grupo Controle. ** Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,01$) na atividade da enzima ALT nos animais do grupo *C. reticulata* 200 mg quando comparados ao grupo Malária. *** Representa que houve diferença significativa ($p < 0,001$) na atividade da enzima ALT nos animais dos grupos Artemisinina 100 mg e *C. reticulata* 100 mg quando comparados com o grupo Malária (ANOVA, seguido de teste Tukey).

A análise da concentração plasmática da Bilirrubina Total demonstrou que houve um aumento significativo ($p < 0,001$) nos níveis desta molécula no grupo Malária ($1,51 \pm 0,06$ mg/dL), quando comparado ao grupo Controle ($0,83 \pm 0,02$ mg/dL). Quando avaliamos os grupos tratados com Artemisinina 100 mg ($0,94 \pm 0,02$ mg/dL), *C. reticulata* 200 mg ($0,93 \pm 0,03$ mg/dL), *C. reticulata* 100 mg ($1,01 \pm 0,05$ mg/dL) e *C. reticulata* 10 mg ($1,20 \pm 0,04$ mg/dL) percebemos que houve uma redução significativa ($p < 0,0001$) nos níveis de Bilirrubina Total quando comparados ao grupo Malária (Gráfico 05).

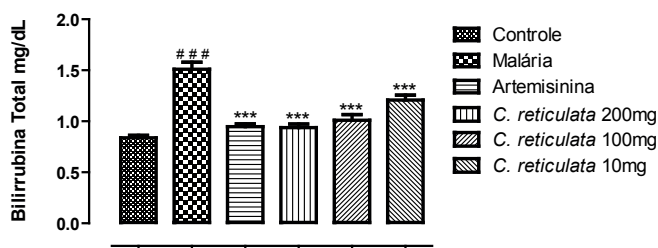


Gráfico 05. CONCENTRAÇÃO DE BILIRRUBINA TOTAL. Cada barra representa média $\pm$ e.p.m. da concentração de Bilirrubina Total plasmática dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve diferença significativa ($p < 0,001$) na concentração da Bilirrubina Total nos animais do grupo Malária quando comparados aos animais do grupo Controle. *** Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) na concentração da Bilirrubina Total nos animais dos grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido de teste Tukey).

Quando realizamos a análise dos níveis de Bilirrubina Indireta podemos observar que houve diferença significativa ($p<0,001$) nos níveis desta molécula nos animais do grupo Malária ($0,88\pm0,03$ mg/dL) quando comparados ao grupo Controle ($0,16\pm0,03$ mg/dL). Nos animais tratados com Artemisinina 100 mg ($0,18\pm0,02$ mg/dL), *C. reticulata* 200 mg ($0,15\pm0,02$ mg/dL) e *C. reticulata* 100 mg ($0,23\pm0,03$ mg/dL), houve uma redução significativa ($p<0,001$) nos níveis de Bilirrubina Indireta, quando comparados ao grupo Malária (Gráfico 06). Entretanto, a *C. reticulata* 10 mg ($1,20\pm0,04$ mg/dL) não reduziu significativamente ($0,76\pm0,03$ mg/dL) os níveis de Bilirrubina Indireta.

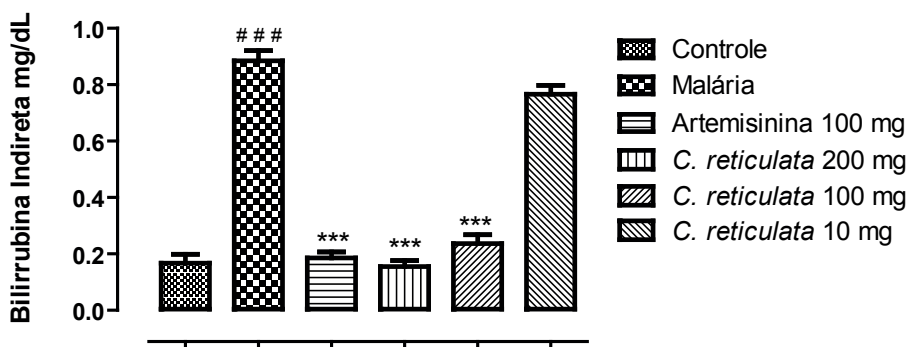


Gráfico 06. CONCENTRAÇÃO DE BILIRRUBINA INDIRETA. Cada barra representa média $\pm$ e.p.m. da concentração de Bilirrubina Indireta plasmática dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) nos níveis de Bilirrubina Indireta nos animais do grupo Malária e *C. reticulata* 10 mg, quando comparados aos animais do grupo Controle. *** Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) nos níveis de Bilirrubina Indireta nos animais dos grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg e *C. reticulata* 100 mg quando comparados com o grupo Malária (ANOVA, seguido de teste Tukey).

Ao realizamos a análise dos níveis de Bilirrubina Direta (BD) podemos observar que houve diferença significativa ($p<0,001$) nos níveis de BD nos animais do grupo Malária ($0,19\pm0,03$ mg/dL), quando comparados ao grupo Controle ($0,67\pm0,02$ U/L). Quando avaliamos os demais grupos podemos observar que nos animais tratados com Artemisinina 100 mg ($0,76\pm0,02$ mg/dL), *C. reticulata* 200 mg ($0,78\pm0,02$ mg/dL) e *C. reticulata* 100 mg ($0,77\pm0,03$ mg/dL), houve um aumento significativo ($p<0,001$) nos níveis de Bilirrubina Direta, quando comparados ao grupo Malária (Gráfico 07). No grupo *C. reticulata* 10 mg ($0,26\pm0,04$ mg/dL), não houve diferença significativa, quando comparado com o grupo Malária.

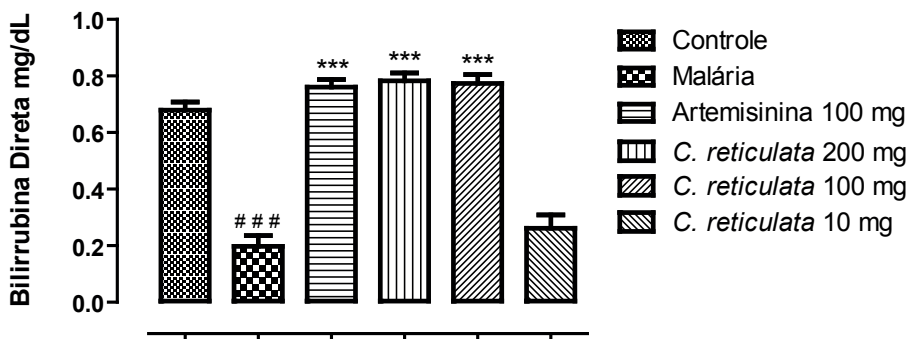


Gráfico 07. CONCENTRAÇÃO DE BILIRRUBINA DIRETA. Cada barra representa média $\pm$ e.p.m. da concentração de Bilirrubina Direta plasmática dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) nos níveis de Bilirrubina Direta nos animais do grupo Malária quando comparados aos animais do grupo Controle. *** Representa que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) nos níveis de Bilirrubina Direta nos animais dos grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg e *C. reticulata* 100 mg quando comparados com o grupo Malária (ANOVA, seguido de teste Tukey).

A análise do nível plasmático da atividade da enzima Fosfatase Alcalina demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,001$) nos animais do grupo Malária ($8,88 \pm 0,51$ U/L), quando comparados ao grupo Controle ($7,27 \pm 0,15$ U/L), e nos grupos tratados, apenas os animais do grupo Artemisinina 100 mg apresentou redução significativa nos níveis da atividade da enzima Fosfatase Alcalina ($7,66 \pm 0,35$ U/L) quando comparados ao grupo Malária (Gráfico 08).

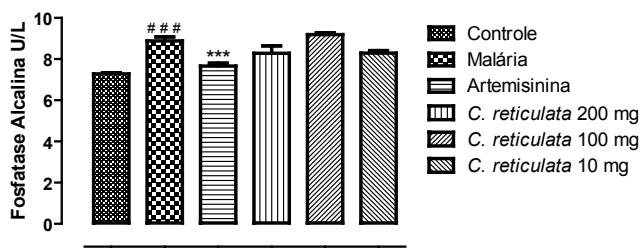


Gráfico 08. CONCENTRAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA. Cada barra representa média $\pm$ e.p.m. da concentração de Fosfatase Alcalina no plasma dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve diferença significativa ($p < 0,001$) na concentração de Fosfatase Alcalina do grupo Malária quando comparado ao grupo Controle. *** Representa que houve diferença significativa ($p < 0,001$) na concentração de Fosfatase Alcalina dos animais do grupo Artemisinina 100 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL

A análise da concentração da Uréia plasmática demonstrou que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) do grupo Malária ($60,88\pm2,88$ mg/dL) quando comparados ao grupo Controle ($21,46\pm2,34$ mg/dL). Podemos observar também que os grupos tratados com Artemisinina 100 mg ($29,86\pm3,17$ mg/dL), *C. reticulata* 200 mg ($34,57\pm3,17$ mg/dL) e *C. reticulata* 100 mg ($36,14\pm5,79$ mg/dL) sofreram uma redução significativa, ($p<0,001$), nos níveis de Uréia quando comparados ao grupo Malária, enquanto que o tratamento com *C. reticulata* 10 mg ($62,57\pm0,97$ mg/dL) demonstrou não ser capaz de reduzir os níveis, significativamente, comparado ao grupo Malária (Gráfico 09).

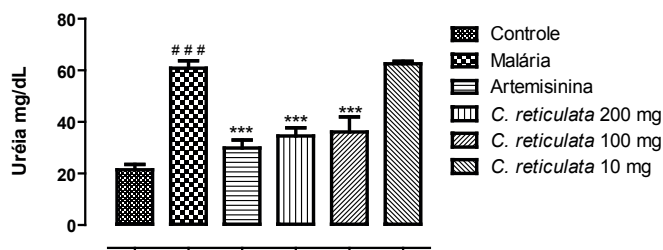


Gráfico 09. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE URÉIA. Cada barra representa média $\pm$ e.p.m. da concentração de Uréia no plasma dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve diferença significativa ($p<0,001$) na concentração de Uréia plasmática dos animais do grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. *** Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) entre os animais dos grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg e *C. reticulata* 100 mg e o grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).

A análise da concentração de Creatinina plasmática demonstrou que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) do grupo Malária ($3,21\pm0,21$ mg/dL) quando comparado ao grupo Controle ($1,58\pm0,03$ mg/dL), resultado apresentado no Gráfico 10, onde também podemos observar que os tratamentos realizados com Artemisinina 100 mg ($1,34\pm0,06$ mg/dL), *C. reticulata* 200 mg ($1,91\pm0,07$ mg/dL), *C. reticulata* 100 mg ($1,42\pm0,20$ mg/dL) e *C. reticulata* 10 mg ($1,77\pm0,03$ mg/dL) promoveram uma redução significativa com $p<0,001$ na concentração da Creatinina plasmática, quando comparados ao grupo Malária.

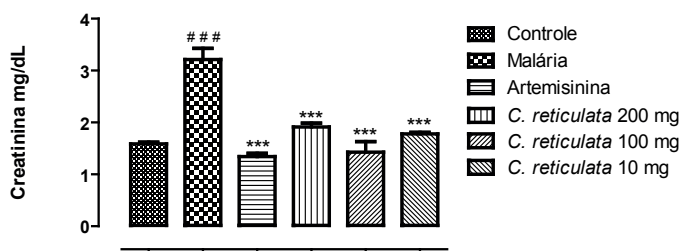


Gráfico 10. CONCENTRAÇÃO DE CREATININA. Cada barra representa média±e.p.m. da concentração de Creatinina plasmática dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve diferença significativa ($p<0,001$) na concentração de Creatinina plasmática dos animais do grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. *** Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) entre o grupo Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg quando comparado ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).

4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A análise hematológica da série vermelha demonstrou através da quantificação de hemácias que houve uma redução significativa ($p<0,001$) no número destas células no grupo Malária quando comparados ao grupo Controle, resultado apresentado na Tabela 4. Quando realizamos a comparação do grupo Malária com os grupos que receberam tratamento com Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg, podemos perceber que o número de hemácias nos animais tratados foi significativamente ($p<0,001$) maior, comparado ao grupo Malária, sendo que o número de hemácias nos grupos tratados, são semelhantes aos dos animais que não foram infectados (Controle) (Tabela 4).

A avaliação do hematócrito demonstrou que houve uma redução significativa deste parâmetro ($p<0,001$) do grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. Quando avaliamos os resultados do hematócrito e comparamos aos grupos de tratamento Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg, e *C. reticulata* 10 mg podemos perceber, que o tratamento, leva a um aumento significativo ($p<0,001$) no percentual de hematócrito destes animais (Tabela 4).

A concentração de hemoglobina visualizada na análise hematológica demonstrou que houve uma redução significativa ($p<0,001$) deste parâmetro no grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. Este fato não foi visualizado nos grupos que receberam tratamento: Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg, e *C. reticulata* 10 mg, os quais, apresentaram valores de hemoglobina semelhante ao do grupo controle (Tabela 4).

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) visualizada através da

análise hematológica demonstrou que não houve uma diferença neste parâmetro no grupo Malária quando comparados ao grupo Controle ou Artemisinina 100mg. Porém, quando comparamos o grupo Malária aos grupos que receberam tratamento com a *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg, e *C. reticulata* 10 mg, verificamos que houve um aumento significativo ($p<0,001$) no parâmetro hematológico CHCM destes animais (Tabela 4).

A análise da concentração média de hemoglobina (HCM) demonstrou que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) do grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. A análise deste parâmetro também foi comparada entre os grupos Malária e os Grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg, e *C. reticulata* 10 mg, assim podemos observar que houve um aumento significativo ($p<0,01$) nos valores de HCM dos grupos tratados (Tabela 4).

A quantificação de plaquetas, realizada através da análise hematológica, demonstrou que houve uma redução estatisticamente significativa ($p<0,001$) do grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. A mesma análise quantitativa de plaquetas demonstrou que houve um aumento significativo ($p<0,001$) no número de plaquetas dos grupos tratados com Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg, e *C. reticulata* 10 mg quando comparado ao grupo Malária, resultado este que se assemelham aos valores de plaquetas dos animais Controles (Tabela 4).

	N. Hemácias 10 ⁶ /µl	Hematócrito %	Hemoglobina g/dL	HCM Pg	CHCM g/dL	PLT 10 ⁹ /µl
Controle	9,34±0,23	47,89±1,27	14,09±0,43	15,01±0,13	30,04±0,27	752,7±54,81
Malária	3,96±0,54###	23,89±2,78###	6,97±0,81###	13,84±0,28###	29,86±0,17	314,0±19,28###
Artemisinina 100 mg	10,02±0,07***	49,77±1,86***	14,89±0,16***	14,74±0,09***	29,70±0,25	844,8±37,28***
<i>C. reticulata</i> 200 mg	9,36±0,17***	46,21±0,86***	14,69±0,26***	15,66±0,08***	31,73±0,21***	724,7±34,48***
<i>C. reticulata</i> 100 mg	9,62±0,21***	45,44±2,59***	14,97±0,37***	15,41±0,09***	31,14±0,14***	738,9±33,30***
<i>C. reticulata</i> 10 mg	9,20±0,21***	43,29±1,54***	14,77±0,49***	15,90±0,19**	32,88±0,44***	687,3±32,32***

Tabela 4. ANÁLISE HEMATOLÓGICA – HEMOGRAMA

Tabela 4. Comparação das médias ± e.p.m. dos parâmetros hematológicos da série vermelha do sangue dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve diferença significativa ($p<0,001$) nos parâmetros hematológicos da serie vermelha dos animais do grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. ** Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,01$) nos parâmetros da Hemoglobina Corpuscular Média dos animais do grupo *C. reticulata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária. *** Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) nos parâmetros hematológicos da serie vermelha dos animais dos grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).

A análise do número de leucócitos demonstrou que houve um aumento significativo ($p<0,001$) no número destas células no grupo Malária quando comparados ao grupo Controle, dados apresentados na Tabela 5. Os resultados mostram que os grupos tratados com Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg, e *C. reticulata* 10 mg apresentam uma redução significativa ($p<0,001$), nos números de leucócitos, quando comparados ao grupo Malária. O resultado do número de leucócitos nos grupos de animais tratados foi semelhante aos dos animais controles. Ao analisarmos a contagem diferencial de Linfócitos, Monócitos e Segmentados percebemos que o número absoluto de Linfócitos se assemelha ao perfil de resultado visto na contagem de leucócitos, sendo que o grupo Malária sofreu uma significativa elevação no número destas células, resultado este que foi revertido, com os tratamentos nos diversos grupos experimentais. O mesmo padrão de resultados foi visualizado quando observamos os valores de Monócitos e de células polimorfo-nucleares (Tabela 5).

	N. Leucócitos 10 ³ /μl	Linfócitos 10 ³ /μl	Monócitos 10 ³ /μl	Segmentados 10 ³ /μl
Controle	5,27±0,73	3,40±0,55	0,33±0,15	1,87±0,50
Malária	126,50±1,11###	87,7±8,45###	4,37±0,37###	20,77±2,02###
Artemisinina 100 mg	4,52±0,39***	2,83±0,50***	0,16±0,02***	1,52±0,14***
<i>C. reticulata</i> 200 mg	5,32±0,68***	3,72±0,70***	0,25±0,10***	2,12±0,33***
<i>C. reticulata</i> 100 mg	4,35±0,40***	2,73±0,38***	0,10±0,04***	1,30±0,15***
<i>C. reticulata</i> 10 mg	6,44±0,46***	5,00±0,94***	0,17±0,03***	1,76±0,34***

Tabela 5. ANÁLISE HEMATOLÓGICA – LEUCOGRAMA.

Tabela 5. ANÁLISE HEMATOLÓGICA – SÉRIE BRANCA. Comparação das médias ± e.p.m. dos parâmetros hematológicos da série branca do sangue dos animais dos grupos Controle, Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. ### Representa que houve diferença significativa ($p<0,001$) nos parâmetros hematológicos da série branca dos animais do grupo Malária quando comparados ao grupo Controle. *** Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) nos parâmetros hematológicos da série branca dos animais dos grupos Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).

4.6 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIDA DOS ANIMAIS

Ao analisarmos o tempo de sobrevivência dos animais, após a inoculação do *Plasmodium berghei*, podemos verificar que tanto os animais que receberam as diferentes doses de *C. reticulata*, como os animais tratados com Artemisinina 100 mg, sobreviveram por um período que ultrapassou as 4 semanas de observação, contabilizando no total 28

dias, da data de inoculação do *P. berghei*. Entretanto os animais do grupo Malária, que não receberam tratamento, foram a óbito no 13° e 16° dia após a data de inoculação.

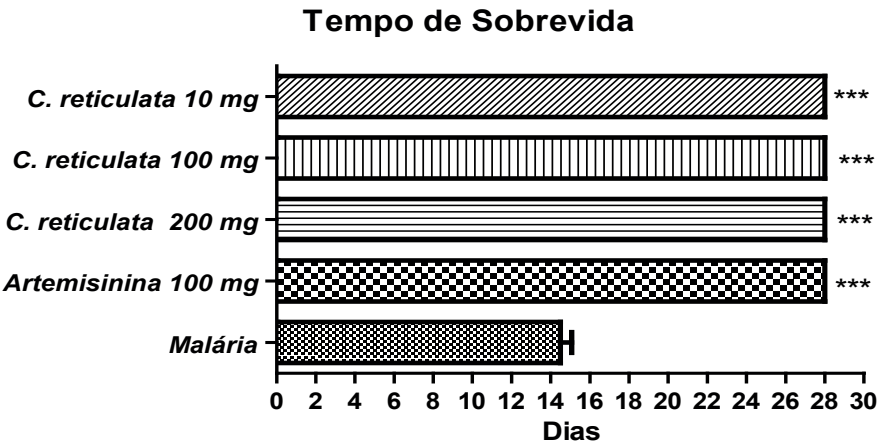


Gráfico 11. TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS. Cada barra representa o tempo, expresso em dias, de sobrevivência dos animais após a inoculação do *Plasmodium berghei*, nos grupos experimentais Malária, Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg. *** Representa que houve uma diferença significativa ($p<0,001$) no tempo de vida dos animais dos grupos tratados com Artemisinina 100 mg, *C. reticulata* 200 mg, *C. reticulata* 100 mg e *C. reticulata* 10 mg quando comparados ao grupo Malária (ANOVA, seguido do teste Tukey).

DISCUSSÃO

Inicialmente avaliamos da toxicidade aguda do oleorresina da *C. reticulata*, e observamos que nossos resultados corroboram com dados já apresentados por Sachetti et al, (2009). Outros estudos que abrangem outras espécies de *Copaifera* também mostraram baixa toxicidade, mesmo com doses mais altas que as propostas neste estudo. A não observação de sinais clínicos de toxicidade ou de variação de peso mostra-se importante, principalmente porque no quadro malárico o animal pode apresentar alguns sintomas pertencentes aos dois quadros, como alteração na pelagem, letargia e diminuição de peso.

As alterações fisiopatológicas que são promovidas pela infecção mediada pelo *Plasmodium berghei* são dependentes de diversos fatores envolvidos na complexa relação entre o parasita e o hospedeiro, neste aspecto, o estudo das complicações hepáticas, renais e hematológicas, as quais foram alvos da análise de nosso estudo, podem evidenciar o quadro de infecção e também demonstrar a ação terapêutica do tratamento empregado.

A análise realizada sobre o nível de parasitemia dos grupos experimentais demonstrou que o tratamento com o oleorresina da *C. reticulata* leva a um importante controle sobre a evolução dos níveis parasitêmicos dos animais infectados em todas as doses estudadas, esta redução pode estar relacionada à possível capacidade do oleorresina da *C. reticulata* em causar diretamente a destruição do parasita, fato este, que resulta em uma importante eficácia terapêutica desta planta no tratamento da malária experimental em camundongos BALB/c. Quando avaliamos os resultados dos níveis de parasitemia dos animais infectados após o 4º dia da inoculação do plasmódio, podemos observar que a redução no número de plasmódios foi semelhante ao resultado apresentado pela droga padrão, a Artemisinina. Sabe-se que o ciclo metabólico do *Plasmodium berghei* se assemelha ao dos outros agentes causadores de infecções em humanos, desta forma, nossos resultados com a *C. reticulata*, torna-se importante como uma possível droga para a tratamento contra a malária.

Além da eficácia demonstrada em nosso estudo, na redução dos níveis de parasitemia na malária experimental, o oleorresina da *C. reticulata* já demonstrou atividade antiparasitária sobre outros parasitas, como o *Trypanosoma cruzi*, onde a planta demonstrou uma efetiva capacidade de degradação do parasita (AMBRÓSIO et al., 2008) e no estudo de Santos et al. (2008), com oleorresina da *Copaifera reticulata*, o tratamento foi capaz de inibir o crescimento das formas amastigotas e promastigotas e *L. amazonensis*, reforçando assim a capacidade do oleorresina como possível agente antiparasitário.

Estudos da composição fitoquímica do oleorresina da planta, mostram a presença de sesquiterpeno β -Cariofileno como composto majoritário no óleorresina do gênero *Copaifera* (VEIGA JR e PINTO, 2002), isto sugere, que este grupo de substâncias podem ser responsáveis pela ação terapêutica do oleorresina. As análises farmacológicas verificadas em outros estudos, remetem as atividades anti-inflamatória (SILVA et al., 2012), antifúngica (DEUS et al., 2011), antimicrobiana (SANTOS et al., 2008; MENDONÇA

e ONOFRE, 2009; PIERI et al., 2010) e anti-parasitária (*L. amazonenses*) (VEIGA JR e PINTO, 2002; DORNELES et al., 2013; SANTOS et al., 2013), entre outras atividades descrita em diversos estudos por vários autores. Além dos compostos majoritários do oleorresina, podemos observar também a presença de outro sesquiterpeno com atividade farmacológica comprovada que é o β -bisaboleno, o qual apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em outros estudos realizados (VEIGA JR E PINTO, 2002; PIERI et al., 2009). Estas evidências reforçam o resultado encontrado no nosso trabalho, onde o tratamento com o oleorresina, foi capaz de reduzir a parasitemia dos grupos experimentais, além de modificar outros parâmetros estudados.

Quando avaliamos os resultados do nosso estudo através da análise da supressão da parasitemia, calculada com uma fórmula que correlaciona o número de parasitas do grupo malária não tratado com os grupos tratados, observamos que houve uma supressão significativa da parasitemia no final do tratamento de 7 dias, nos grupos de tratamento com a *C. reticulata* 200 mg e 100 mg. Estes dois grupos apresentaram resultados de supressão semelhantes ao grupo tratado com a Artemisinina 100 mg. Porém esta mesma supressão demonstrou não estar presente no grupo de animais tratados com a menor dose (10 mg) de *C. reticulata*.

Quando realizamos uma análise comparativa com outros estudos que avaliaram a atividade antimalárica de plantas, em modelo in vivo de malária experimental, com constituintes semelhantes ao da *C. reticulata*, podemos perceber que estas análises corroboram com os resultados encontrados no nosso trabalho. Um estudo realizado por Mota (2009), com óleos essenciais das espécies *V. arbórea* e *L. sidoides*, demonstrou que a espécie *V. arbórea* possui atividade antimalárica, e a redução parasitária só ocorreu a partir do 7º dia de tratamento, estando de acordo com nosso modelo experimental. O trabalho realizado por Orwa et al. (2013), também avaliou a atividade antimalárica da planta *Toddalia asiática* Lam., e mostrou que o extrato aquoso (250 mg/kg) reduziu em 56.8% a parasitemia de camundongos infectados com o *P. berghei*.

Quando correlacionamos os nossos achados aos estudos realizados por outros autores que utilizaram plantas com constituintes semelhantes ao da *C. reticulata*, podemos observar que no estudo realizado por Okokon et al. (2012), o qual analisou a *Clausena anisata*, uma planta que apresenta em sua composição fitoquímica a cumarina, limonóides, alcaloides, monoterpenos, lactonas e óleos essenciais, verificou-se que *in vivo* o extrato bruto e as frações aquosa e clorofórmio desta planta reduz em até 82,02% a parasitemia no 7º dia do experimento. O trabalho de Endale et al. (2013) onde foram realizados testes em modelo experimental murino, utilizando a planta *Otostegia integrifolia* Benth, nativa da África Tropical, constatou que a planta é capaz de promover uma supressão parasitêmica de 80,52%, isso quanto ela foi administrada na dose de 600 mg/Kg/dia. A atividade antiparasitária apresentada por esta planta se deve ao diterpeno Otostegindiol, uma vez que quando testada a sua fração isolada, houve uma supressão da parasitemia de 73,16%.

Os constituintes fitoquímicos da *C. reticulata* se assemelham aos encontrados nas plantas citadas acima, o que reforçam as características antiparasitárias vistas no nosso estudo.

Os estudos que avaliam a composição fitoquímica do oleorresina de *C. reticulata* demonstram também a presença de terpenóides, identificando como compostos majoritários o β -bisaboleno (sesquiterpeno), o qual possui é descrito por possuir atividade anti-inflamatória (BOAROTO, 2014), seguido do β -cariofileno, com atividade anti-inflamatória, antitumoral e bactericida (VEIGA JR e PINTO, 2002). O ácido Kaureônico (ou ácido Copálico) é o diterpeno majoritário em 30% dos oleorresinas de Copaíbas, e entre as suas atividades biológicas identificadas, estão a atividade anti-inflamatória, antibactericida e sobre a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* (LEANDRO et al. 2012). Avaliação da ação dos sesquiterpenos realizada em cultura de *P. falciparum* demonstrou suprimir o desenvolvimento deste *plasmodium in vitro*, se assemelhando ao resultado encontrado no nosso estudo em modelo murino, sugerindo que estes constituintes químicos encontrados na *C. reticulata*, sejam os responsáveis pela ação antiparasitária, observados em nosso trabalho.

A densidade parasitária mantém uma íntima relação com os níveis de glicose plasmática, havendo uma relação inversamente proporcional entre a parasitemia e os níveis glicêmicos. Em nosso estudo, podemos verificar que a *C. reticulata* promoveu uma redução significativa nos níveis de parasitemia, o que pode ter contribuído para uma consequente redução no estímulo de liberação de insulina do tecido beta pancreático, e também pelo menor consumo de glicose induzido pela infecção, melhorando assim os níveis glicêmicos dos animais tratados quando foram comparados ao grupo infectado que não recebeu o tratamento. Os níveis de glicose tendem a ficar baixos durante uma infecção malárica, resultantes não só do consumo de glicose pelo parasita, mas também por alterações no funcionamento hepático e renal que dificultam o processo de gliconeogênese, além da própria debilidade física (prostração) que pode influenciar no hábito alimentar dos indivíduos com malária (LACERDA, 2007).

Quando observamos casos de infecção severa, como o que pode ser visto neste modelo experimental, ocorrem as alterações sobre os níveis glicêmicos. Estudos realizados por Mehta, Sonawat e Sharma (2006), mostram que os eritrócitos parasitados utilizavam cerca de 100 vezes mais glicose quando comparadas aos eritrócitos não parasitados, e que esse consumo de glicose coincide com a fase trofozoíta do parasita, pois é o período de maior atividade metabólica deste agente. Nossos dados corroboram com estudos anteriores, visto que, a redução da parasitemia pode ter contribuído para a manutenção dos níveis glicêmicos nos animais tratados com a *C. reticulata*.

A infecção pelo *plasmodium* pode atingir diversos sistemas orgânicos, sendo que a falência de algum órgão, pode estar relacionada as alterações promovidas pelo agente infeccioso durante o processo inflamatório desenvolvido em decorrência da infecção pelo *Plasmodium*. Dentre as alterações orgânicas visualizadas no quadro clínico desenvolvida

na malária em humanos, podemos observar que nos pacientes com malária grave causada pelo *P. falciparum*, 84% dos pacientes apresentaram várias complicações, sendo as mais frequentes, a hiperparasitemia (40%) e danos hepáticos (36%) (TOBÓN et al., 2006). A infecção pelo *Plasmodium berguei* se assemelha ao quadro clínico da infecção pelo *P. falciparum*, assim podemos correlacionar o nível de parasitemia com danos renais, através da análise dos parâmetros bioquímicos da função hepática, como os níveis das atividades das enzimas AST, ALT, Fosfatase Alcalina e da Bilirrubina. A utilização destas moléculas como marcadores de lesão hepática se explica pela prevalência destas enzimas no fígado.

O óleo-resina de *C. reticulata* foi capaz de reduzir o nível de atividade das enzimas utilizadas como parâmetros de função hepática, a AST e ALT, os valores encontrados destas enzimas se aproximaram aos níveis visualizados nos animais tratados com a droga padrão utilizada, Artemisinina. Estudos mostram que a falha hepática está relacionada com a proliferação de células retículo endoteliais, congestão de vasos hepáticos, infiltração periportal, e dilatação sinusoidal o que promove alterações diretas sobre o sistema hepático, aumentando o risco de falência do órgão além de potencializar alterações metabólicas sobre os níveis glicêmicos (GOMES et al., 2011).

No modelo experimental de malária, empregado em no nosso estudo, as alterações hepáticas estão bastante evidenciadas, caracterizadas não somente pela elevação das enzimas AST e ALT, mas também por alterações sobre os níveis da enzima Fosfatase Alcalina, que está presente na membrana celular de praticamente todos os tecidos. Porém, seus níveis estão elevados em membranas celulares que revestem o epitélio intestinal, túbulos renais, osteoclastos, fígado e canalículos biliares, além da placenta. Desta forma, distúrbios do trato hepático e biliar elevam a Fosfatase Alcalina plasmática (AGUENA, 2010). Nossos resultados demonstraram que o óleo-resina de *C. reticulata* não foi capaz de reduzir os níveis desta enzima, alterados pela infecção.

Outro indicativo de lesão hepática é a elevação nos níveis de Bilirrubina Total e Indireta, o que caracteriza a falha na capacidade hepática do metabolismo da Bilirrubina e também no aumento da hemólise promovido pelo ciclo eritrocítico do parasita (Amaral et al., 2003). A capacidade do óleo-resina de *C. reticulata* de promover redução nos níveis parasitemicos, pode reduzir a lesão hepática, o que contribui diretamente sobre a melhora na capacidade de detoxificação do fígado em relação a concentração de Bilirrubina. Sugerindo, que o tratamento com a *C. reticulata*, é capaz de reduzir os níveis de Bilirrubina Total e Indireta, através de dois principais mecanismos, o primeiro, que pode ser mediado por uma melhora na função hepática, devido a redução do número de parasitas circulantes e consequente diminuição da resposta inflamatória tecidual, e o segundo, podendo ser através da redução direta dos níveis parasitemicos, o que leva a uma e consequente redução na destruição de eritrócitos, o que por sua vez também pode reduzir os níveis de Bilirrubina Total e Indireta circulante (MARTELLI, 2012).

Outros danos que podem acometer indivíduos com malária, são as lesões renais,

que podem estar relacionadas a alta parasitemia, onde os eritrócitos parasitados tornam-se rígidos, o que diminui sua deformabilidade e altera sua conformação, além de aumentar a viscosidade sanguínea, fato este que leva a uma lentificação da microcirculação, alterando o fluxo sanguíneo renal (MOREAU et al., 2012). E ainda, uma outra alteração encontrada está relacionada à citoaderência de eritrócitos infectados pelo plasmódio, o que prejudica ainda mais a circulação local agravando o quadro de lesão renal. Por outro lado, a presença de fatores inespecíficos associados à infecção malárica pode conduzir a alterações de fluxo sanguíneo renal, lesões no endotélio e lesões tubulares, que podem agravar o quadro e conduzir para uma insuficiência renal. O sistema imunológico pode estar envolvido no processo de lesão renal participando ativamente do processo de destruição do sistema renal, mediado através da liberação de citocinas vasoativas, que podem induzir ao aumento da vasoconstrição e liberação de catecolaminas, este mecanismo promove um severo comprometimento hemodinâmico renal (SIMÃO, STONE E ALMEIDA, 2003; CLARK et al., 2006).

A avaliação da função renal foi realizada através dos níveis de Ureia e Creatinina plasmática. Nossos resultados demonstraram, que o tratamento com o óleo-resina de *C. reticulata* reduziu os níveis plasmáticos de Uréia e Creatinina nos grupos tratados.

A redução nos níveis de Uréia e Creatinina indica que o óleo-resina pode estar contribuindo na redução da lesão renal, podendo estar relacionado diretamente à melhora da microcirculação tecidual, mediada através da redução da citoaderência de eritrócitos, uma vez que houve uma significativa redução da parasitemia, e também sobre a capacidade do óleo-resina em promover efeitos anti-inflamatórios, o que pode reduzir a liberação de citocinas e principalmente diminuir a concentração de substâncias vasoconstritoras locais (GOMES et al., 2011).

Brito et al. (2005) avaliaram os níveis de Ureia e Creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. Os autores observaram que a administração prévia de óleo de Copaíba, por gavagem durante sete dias, diminuiu os níveis séricos de Ureia em 24 h e 48 h, e os de Creatinina nas 48 h, após o procedimento de isquemia e reperfusão renal em ratos. Considerando as devidas diferenças nas metodologias propostas pelo estudo de Brito et al. (2005), em comparação aos resultados obtidos no nosso estudo, percebemos que a o óleo-resina de Copaíba realmente promoveu uma melhora na microcirculação renal, reduzindo assim os mecanismos inflamatórios desencadeadores da lesão renal, no modelo experimental empregado no nosso trabalho, visto que reduziu os níveis de Uréia e Creatinina, que são parâmetros bioquímicos de análise de lesões destes órgãos.

Além de todas as alterações orgânicas citadas anteriormente, sabemos também que o ciclo hematológico do parasita é um importante fator que contribui para a gravidade da doença, levando a sérias complicações no quadro desenvolvido pela malária. Estas alterações hematológicas são comuns na malária e tem uma íntima relação com a

morbimortalidade da doença. Porém, quando analisamos o quadro clínico da malária em humanos, podemos perceber que existem diferenças nessas alterações hematológicas, as quais estão relacionadas com o nível de endemicidade da região em que o indivíduo vive, fatores genéticos do hospedeiro, além do próprio parasita modificar estas características (OLIVEIRA, 2010; AMARAL et al., 2003).

Nossos resultados demonstraram, que a infecção pelo *P. berghei*, leva a um quadro de severas alterações nos parâmetros hematológicos analisados. Podemos verificar que os níveis de hemoglobina mantiveram-se acima de 14,0 g/dL nos grupos tratados com o oleorresina, enquanto o grupo Malária apresentou uma hemoglobina abaixo de 7,0 g/dL, caracterizando assim o quadro de anemia deste grupo. Esta alteração está diretamente relacionada ao processo de hemólise mediado pelo agente infeccioso. Entretanto, quando analisamos outros estudos realizados em modelos murinos, podemos verificar que o plasmódio leva a uma potente resposta inflamatória, que atinge os eritrócitos infectados e não infectados e que contribui para o dano oxidativo da célula, culminando o quadro de hemólise (MOREAU et al. 2012). Além disso, outros mecanismos também estão envolvidos na lesão de eritrócitos, o estudo de Totino et al (2010), relacionou a indução da apoptose de hemácias parasitadas e não parasitadas como um dos mecanismos de complicação no quadro de anemia.

Podemos perceber que o oleorresina da *C. reticulata*, em todas as doses empregadas, conseguiu manter o número de hemácias em valores semelhantes ao do grupo Controle, apresentando um resultado terapêutico que se assemelha ao do grupo tratado com a droga padrão, Artemisinina na dose de 100mg. Além disso, as mesmas características foram observadas quando analisamos a concentração de Hemoglobina, demonstrando assim a eficácia do tratamento com o oleorresina sobre a melhora dos principais parâmetros hematológicos estudados. O mecanismo exato de como a *C. reticulata* atua neste processo não foi elucidado neste estudo. Porém quando analisamos outros trabalhos que utilizaram o modelo experimental semelhante ao utilizado neste estudo, verificamos que a melhora do quadro anêmico pode ser promovida por mecanismos antioxidantes, resultando em uma redução da hemólise dos eritrócitos (OLUWATOSIN et al. 2014).

A concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) também apresentou diferença significativa nos grupos tratados com a *C. reticulata* quando foram comparados ao grupo Malária. Porém quando realizamos a análise comparativa, percebemos que a redução no CHCM, do grupo malária não foi significativa em relação aos animais do grupo controle. O resultado encontrado no parâmetro hemoglobina corpuscular média (HCM) reforça a informação de uma redução nos níveis de hemoglobina evidenciando que houve uma redução do quantitativo de hemácias e na concentração da hemoglobina que está presente no eritrócito nos animais infectados e não que não receberam tratamento. O resultado destes parâmetros, associados aos valores do hematócrito, observados nos animais do grupo malária, demonstram que a infecção resulta em uma degradação

eritrocítica e também no consumo intracelular de hemoglobina, além disso, podemos visualizar a capacidade da *C. reticulata* em reduzir estas alterações hematológicas.

Outra alteração proporcionada pela infecção pelo plasmódio é o quadro de plaquetopenia que é considerado a partir de uma contagem inferior a 180.000 plaquetas na corrente sanguínea (AMARAL et al., 2003). A alteração do número de plaquetas é um dado importante em estudos sobre a malária, uma vez que a plaquetopenia é uma alteração clínica frequentemente visualizada em indivíduos infectados pelo plasmódio. Outro dado importante refere-se ao número de plaquetas, visto que, ele é inversamente proporcional a quantidade de parasita sendo que as plaquetas tendem a aumentar conforme diminui a parasitemia. Esta característica de inversão na proporcionalidade pode ser visualizada no nosso estudo, onde o tratamento com a *C. reticulata* resulta em uma melhora nos níveis destas células de forma semelhante os valores obtidos nos animais do grupo controle.

O quadro infeccioso visualizado no modelo experimental empregado neste estudo promoveu um aumento significativo sobre o perfil de leucócitos presentes na corrente sanguínea dos animais analisados. Quando avaliamos o leucograma dos animais infectados e que não receberam tratamento farmacológico, podemos perceber que houve uma elevação acentuada no número destas células na corrente sanguínea. A análise da série branca demonstra uma maior presença de Linfócitos, seguido de um aumento significativo de Monócitos e Segmentados. O alto número de Linfócitos presentes na corrente sanguínea do grupo Malária demonstra a tentativa do sistema imunológico em combater o parasita, buscando assim uma ação celular e citotóxica destas células no combate ao plasmódio.

O tratamento com a *C. reticulata* se assemelhou ao tratamento com a Artemisinina, mantendo os níveis leucocitários baixos. Nossos dados demonstram que no grupo Malária, apresentou a contagem de linfócitos acima de 87.000/mm³ de sangue, evidenciando assim a acentuada linfocitose, demonstrando a tentativa, ineficaz, do sistema imunológico em combater o agente infeccioso. O sistema imunológico é extremamente importante no combate ao parasita, sendo que a produção natural de células do sistema imune pode auxiliar na destruição do parasita em indivíduos infectados, mas geralmente, não se constitui em uma defesa efetiva em caso de infecção pelo plasmódio.

Estudos mostram que nos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção pelo plasmódio, o sistema imunológico do hospedeiro desenvolve uma resposta contra o parasita, que altera todos os componentes do sistema imune (LAMB et al., 2006). Oliveira (2010) realizou um estudo e encontrou valores médios abaixo da normalidade para a contagem de leucócitos, linfócitos e plaquetas, sendo justificada pela provável redistribuição dos leucócitos para locais com processos inflamatórios ativos. Enquanto que, o número de bastões teve a média acima dos níveis normais, o que sugere que há uma maior utilização de neutrófilos do que a capacidade do organismo de produzi-los e maturá-los.

Por fim, realizamos a análise do tempo de sobrevida dos animais, infectados com *P. berghei* e submetidos ou não ao tratamento com a *C. reticulata*. Os resultados mostraram

que o tratamento com o oleorresina ou com a droga padrão, independente da dose utilizada, promoveu um aumento no tempo de vida dos animais, quando comparados aos animais que não receberam qualquer tratamento. Este aumento no tempo de sobrevida pós-tratamento pode estar relacionado com um efeito terapêutico do oleorresina, sobre a redução dos níveis da parasitemia, sendo que a ação terapêutica da *C. reticulata* proporcionou aos animais tratados uma sobrevida durante todo o período de estudo.

CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos pelo estudo, os resultados permitiram as seguintes conclusões:

- A avaliação da toxicidade aguda da *C. reticulata* reafirmou a baixa toxicidade do oleorresina da planta.
- A *C. reticulata* mostrou-se significativamente eficaz na redução da parasitemia, em camundongos BALB/c, infectados pelo *P. berghei*. Demonstrando também que o tratamento proposto com as diferentes doses de oleorresina de *C. reticulata* leva a um aumento dos níveis de glicose dos camundongos infectados pelo *P. berghei*.
- Na avaliação dos parâmetros hematológicos, a *C. reticulata*, nas diferentes doses do tratamento proposto manteve as células da série vermelha e da série branca dentro dos níveis normais, mostrando que a *C. reticulata* suprime as vias que levam ao processo de apoptose e hemólise de hemácias proposto por vários autores e ainda reduz a exacerbação do sistema imune, mantendo os níveis leucocitários dentro da normalidade.
- Ao avaliar a função hepática podemos concluir que a infecção pelo plasmódio exerce influência sobre o nível de atividade das enzimas AST e ALT, e que o tratamento com a *C. reticulata* influencia de forma significativa os níveis desta enzima entre os grupos tratados, comprovando a eficácia da planta na redução da lesão hepática induzida pela malária.
- A atividade da enzima Fosfatase Alcalina não sofre influência direta da infecção ou do tratamento com a *C. reticulata*. Porém o tratamento com o oleorresina nas maiores doses promoveu uma redução na concentração de Bilirrubina Total e de Bilirrubina Indireta, o que evidencia uma melhora no quadro de hemólise, associado a uma maior capacidade hepática de metabolizar esta molécula.
- A *C. reticulata* foi capaz de melhorar a função renal dos camundongos infectados pelo *P. berghei*, uma vez que os níveis de Uréia e Creatinina sofreram uma redução com o tratamento, quando comparados ao grupo Malária.
- O oleorresina da *C. reticulata* mostrou-se eficaz em aumentar o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados pelo *P. berghei*.
- Assim podemos concluir, através deste estudo, que o tratamento com a *C. reticulata* foi capaz de melhorar os aspectos bioquímicos e hematológicos dos animais infectados pelo *P. berghei*, além de atuar de forma direta na redução da parasitemia dos animais infectados, evidenciando assim a atividade antimalárica do oleorresina da *C. reticulata*. Entretanto, são necessários futuros estudos que demonstrem o mecanismo de ação antimalárica da *C. reticulata*.

REFERÊNCIAS

AGUENA, S.M. Estudo das enzimas hepáticas na população Teréna em Mato Grosso do Sul – Brasil. Dissertação apresentada ao PPG em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2010.

ALECRIM W.D., ESPINOSA F.E., ALECRIM M.G. *Plasmodium falciparum* infection in the pregnant patient. **Infect Dis Clin North Am.** v. 14, n.1, p. 83-95, 2000.

AMARAL, C.N. et al. A importância do perfil clínico-laboratorial no diagnóstico diferencial entre malária e hepatite aguda viral. **Jornal de Pediatria.** v. 79, n.5, 2003.

AMBRÓSIO, R. A. et al. Tripanocidal Activity of Pimarane Diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Phytother. Res.** 22: 1413, 2008.

AMIR; AHMADIAN. Stem cell engineering might be protective against severe malaria. **Bioscience Hypotheses**; v. 20; p. 1-2, 2009.

ANDRADE B.B., et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malar J.**v.13, n.9, 2010.

ARTAVANIS-TSAKONAS K, RILEY E.M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J Immunol.** v.169, n.6, p.2956-2963, 2002.

AWANDARE G.A. et al. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria with respiratory distress. **J Infect Dis.** v.194, n.10, p.1438-1446, 2006 .

BALDISSERA, M. D et al. Toxic effect of essential oils (*Copaifera* spp) in the treatment of mice experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, p. 319-324, 2014

BARBOSA-NETO, M.F., SILVA, I.G., SILVA, H.H.G. Atividade larvícida do óleo-resina de *Copaifera langsdorfii*, planta medicinal brasileira, e de suas frações, sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG – CONPEEX – 3. 2006, Goiânia.

BHALLA, A.; SURI, V.; SINGH, V. Malarial Hepatopathy. **J. Postgrad Med.**; v. 42, n. 4; p. 315-320, 2006.

BOAROTO, J.A. Identificação do sesquiterpeno β -cariofileno em óleo de Copaíba utilizando a espectrometria RAMAN. Dissertação apresentada ao Instituto de Engenharia Biomédica, da Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos, 2014.

BOYOM et al. Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engler & Diels and *Uvariastrium pierreanum* Engl.(Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. **Parasitol Res.**, v. 108; p.1211–1217, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial de malária.** Brasília-DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**. Brasília-DF, 2015.

BRASÍLIA (Distrito Federal). Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. Brasília, 2001. 36 p. (Séries Manuais).

BRASÍLIA a (Distrito Federal). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2010. 36 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRITO et al. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2005; 20(3): 243-246.

CABANTOUS S, et al. Genetic evidence for the aggravation of *Plasmodium falciparum* malaria by interleukin 4. **J Infect Dis**. v.200, n.10, p.1530-1539, 2009.

CLARK I.A. et al. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malar J**. v.85, n.5, 2006.

CHAUDHRI G. et al. Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin. **Cell Immunol**. 1988;115(1):204-13.

CORTINA, A.D.M.; TOBÓN, A. Ictericia y hepatopatía en el paciente con malária. **Infectio**. 2010; 14(4): 277-285.

COURA JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

CUNICO, W. et al. Fármacos antimalariais: história e perspectivas. **Rev. Bras. Farm.**, 89(1): 49-55, 2008

DAVIS TM, et al. Changes in the peripheral blood eosinophil count in *falciparum* malaria. **Acta Trop**. 1991; 48(3):243-6.

DEY, S. et al. Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**; v. 46; p. 271-281, 2009.

DEUS, R.J.A., ALVES, C.N., ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13, n.1, p.1-7, 2011.

DIS BORNE, V. J. Renal failure in malaria. **Institute of Life Sciences**; v. 45; p. 83-97, 2008.

DORNELES, F.S. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* in the Copaiba Oil: *In Vitro* Test and in Mice Experimentally Infected with the Parasite. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, 2013.

ELASED, K.M; TAVERNE, J.; PLAYFAIR, H.L. Malaria, blood glucose, and the role of tumour necrosis factor (TNF) in mice. **Clin Exp Immunol**. 1996; 105:443-449.

ENDALE, A. et al. In vivo Antimalarial Activity of a Labdane Diterpenoid from the Leaves of *Otostegia integrifolia* Benth. **Phytother. Res**. 2013; 27: 1805–1809.

- FERNANDES A.A. et al. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. **Clin Vaccine Immunol.** 2008;15(4):650-8.
- FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Quím. Nova**, v.31, n.5, p.1277-1278, 2008.
- FREITAS, L.F.; et al. Malária não complicada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* no Brasil: evidências sobre fármacos isolados e associações medicamentosas empregados em esquemas terapêuticos recomendados pelo protocolo terapêutico oficial. **Caderno de Saúde Pública**; v. 23, n. 10; p. 2285-2294, 2007.
- FREVERT, U.; et al. Imaging effector functions of human cytotoxic CD4⁺ T cells specific for *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. **International Journal for Parasitology**; v. 39; p. 119-132, 2009.
- GANFON, H et al. Antiparasitic activities of two sesquiterpenic lactones isolated from *Acanthospermum hispidum* D.C. **Journal of Ethnopharmacology** 141 (2012) 411– 417.
- GERIS, R. et al. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (diptera, culicidae). **Rev. Inst. Med. Trop**, São Paulo, v.50, n.1, p.25-28, Jan/Feb, 2008.
- GERMANO, N; MENDONÇA, R. P.; MURINELLA, M. Adequação dos fármacos antimaláricos na quimioprevenção e tratamento da malária em países não endêmicos. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**; v. 12, n. 3; p. 165-170, 2006.
- GIRMA S. et al. Effect of crude leaf extract of *Osyris quadripartita* on *Plasmodium berghei* in Swiss albino mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 15, n. 184, 2015.
- GOMES et al. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**. v. 3, n. 23, p. 358-369, 2011.
- GOOD MF, DOOLAN DL. Immune effector mechanisms in malaria. **Curr Opin Immunol**. 1999 Aug;11(4):412-9.
- HALDAR, K; MOHANDAS, N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2009 ; 87–93.
- HANSCHIED T, et al. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. **Malar J**. 2008;7:109.
- HANSEN, D. S.; SCHOFIELD, L. Natural Regulatory T Cells in Malaria: Host or Parasite Allies? **PLoS Pathog**; v. 6 n. 4; p. 1-9, 2010.
- HERMIDA, F.P.d.M.; et al. Wave expansion of CD34⁺ progenitor cells in the spleen in rodent malaria. **Experimental Parasitology**; p.1-7, 2008.
- KREMSNER P.G., et al. Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. **Am J Trop Med Hyg**. 1995 Nov;53(5):532-8.
- KOSSODO S, GRAU GE. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. **J Immunol**. 1993 Nov 1;151(9):4811-20.

LACERDA, M.V.G. Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. Tese apresentada ao PPG em Medicina Tropical, da Universidade de Brasília, 2007.

LANGHORNE J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat Immunol.** 2008 Jul;9(7):725-32.

LEANDRO LM. et al. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules.** 2012, 17, 3866-3889

LEITE et al. Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana Plantas Medicas.** 2013; 18(4): 522-528.

LI, C.; SEIXAS., E.; LANGHORNE , J. Rodent malaria: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. **Med Microbiol Immunol** . 189(3): 115-126, 2001

LAMB T.J. et al. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Rev. Mol Med,** v. 8, n.6, 2006.

LOU J, LUCAS R, GRAU GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clin Microb. Rev.** n.14, 2001.

LUCKHART S. et al. Low levels of mammalian TGF-beta1 are protective against malaria parasite infection, a paradox clarified in the mosquito host. **Exp Parasitol.** 2008 Feb;118(2):290-6.

MACIEL et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova,** Vol. 25, n.3, 429-438, 2002.

MARTELLI, A. Síntese e metabolismo da bilirrubina e fisiopatologia da hiperbilirrubinemia associados à Síndrome de Gilbert: revisão de literatura. **Rev Med Minas Gerais** 2012; 22(2): 216-220.

MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v.19, n.2B, p.577-581, Abr./Jun. 2009.

MEHTA, M.; SONAWAT, H.M.; SHARMA, S. Glycolysis in *Plasmodium falciparum* results in modulation of host enzyme activities. **J Vect Borne Dis** 43, 2006, pp. 95–103

MORDMULLER B.G. et al. Tumor necrosis factor in *Plasmodium falciparum* malaria: high plasma level is associated with fever, but high production capacity is associated with rapid fever clearance. **Eur Cytokine Netw.** 1997 Mar;8(1):29-35

MOREAU R. et al. Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine- treated and *Plasmodium*-infected mice. **PLOS ONE.** 2012, Vol.7; n. 9

MOT A. et al. IL-4 receptor expression on CD8+ T cells is required for the development of protective memory responses against liver stages of malaria parasites. **J Exp Med.** 2005 Aug 15;202(4):551-60.

MOTA, ML. Atividade antimalárica de plantas medicinais da biorregião do Araripe-CE em modelo murinho – *Plasmodium berghei*. Dissertação apresentada ao PPG em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

MUNIZ, J.W.C.et al. Atividade anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelo inflamatório de edema de pata. Tese de doutorado UFPA, 2010.

MURADOR P. et al. Structural aspects of the erythrocyte membrane. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v.29, n.2, p.168-178, 2007.

NERI, S.; et al. Acute renal failure in *Plasmodium malariae* infection. **The Journal of Medicine**; v. 66, n. 4; p. 166-168, 2008.

OECD (*Ornrganization for economic co-operation development*) 2001. **Guideline for testing of chemicals: Acute oral toxicity- acute toxic class method. Guideline: 423** http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf

OKOKON, J.E. et al. Antiplasmodial and analgesic activities of *Clausena anisata*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** (2012)214-219.

OLIVEIRA, CR. Alterações hematológicas e perfil fenotípico das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com malária por *P. vivax* e *P. falciparum* na fase aguda e de convalescença da infecção. Dissertação apresentado ao PPG em Biologia Parasitária, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

OLIVEIRA, E. C. P., LAMEIRA, A. O. , ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleorresina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju, PA. **Rev Bras Plant Medic**, n. 8, p.14-23, 2006.

OLIVEIRA, A.R.M; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 7, 1971-1974, 2009.

OLUBA OM et al. Antimalarial and hepatoprotective effects of crude ethanolic extract of Lingzhi or Reishi medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P.Karst. (Higher Basidiomycetes), in *Plasmodium berghei*-infected mice. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 14(5): 459–466 (2012)

OLUWATOSIN A. et al. Antimalarial potential of kolaviron, a biflavonoid from *Garcinia kola* seeds, against *plasmodium berghei* infection in Swiss albino mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** (2014)97-104

ORWA J.A. et al. Antimalarial and safety evaluation of extracts from *Toddaliaasiatica* (L) Lam. (Rutaceae). **Journal of Ethnopharmacology** 145 (2013) 587–590.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera ssp.*): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

PIERI, F.A., MUSSI, M.C., SCHNEEDORF, J.M., Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.3, p.578-585, 2010.

PIERI, F.A. et al. Bacteriostatic effect of Copaiba Oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Braz. Dent. J.** v.23, n.1, 2012.

PINA-COSTA et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, Vol. 109(5): 618-633, 2014.

QUEIROZ, NL . Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65 – Dissertação - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 2007.

RIDDER S.; et al. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. **Journal of Ethnopharmacology**; v. 120; p. 302-314, 2008.

ROBINSON L.J. et al. Cellular tumor necrosis factor, gamma interferon, and interleukin-6 responses as correlates of immunity and risk of clinical *Plasmodium falciparum* malaria in children from Papua New Guinea. **Infect Immun**. 2009 Jul;77(7):3033-43.

RODRIGUES, M.M.; et al. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**; v. 75, n. 4; p. 443-468, 2003.

ROWE, et al. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Expert. Rev. Mol. Med.**; v. 11, n. 16; p. 1-35, 2010.

SACHETTI, C.G.et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.19, n.4, p. 937-941, Out/Dez. 2009.

SAHU S. et al. Spectrum of malaria complications in an intensive care unit. **Singapore Med. J.**; v. 51, n. 3; p. 226-229, 2010.

SANTOS, A.O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.103, n.3, p.277-281, May, 2008.

SANTOS, A.O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.108, n.1, p.59-64, Feb, 2013.

SHIBUI A. et al. CD4(+) T cell response in early erythrocytic stage malaria: *Plasmodium berghei* infection in BALB/c and C57BL/6 mice. **Parasitol Res**. 2009 Jul;105(1):281-6.

SIEKMANS, K; RECEVEUR, O; HADDAD, S. Can an Integrated Approach Reduce Child Vulnerability to Anaemia? Evidence from Three African Countries. **PLOS ONE**, v. 9; n.2; 2014.

SILVA, R.S.U. et al. Esquemas terapêuticos encurtados para o tratamento de malaria por *Plasmodium vivax*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v. 36 n. 2; p. 235-239, 2003.

SILVA, E.S., et al. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesq. Agropec. Bras., Brasília**, v.47, n.11, p.1621-1628, Nov. 2012.

SIMÃO, C; STONE, R; ALMEIDA, M. Insuficiência renal associada a infecção por *Plasmodium falciparum*. **ACTA MÉDICA PORTUGUESA** 2003; 16: 93-95.

STEVENSON MM, RILEY EM. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol**. 2004 Mar;4(3):169-80.

SZMITKO, P. E.; KOHN, M.L.; SIMOR, A.E. *Plasmodium falciparum* malaria occurring 8 years after leaving an endemic area. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**; v. 63; p. 105-107, 2009.

TABORDA, C., MEHNERT, D.V., SILVA, C.A. **Manual de Normas Técnicas. Biotério de Experimentação** – Departamento de Microbiologia. Instituto de Ciências Biomédicas – USP, 2004.

TOBÓN C.A. et al. Clínica de la malaria complicada debida a *P. falciparum*. Estudio de casos y controles en Tumaco y Turbo (Colombia). **Iatreia**. 2006;19:339-55.

TOTINO, P.R.R et al. Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. **Malaria Journal** 2010, 9:350

TRINDADE, F.T.T. et al. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae). **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v.23, n.3, p.464-470, May/Jun, 2013.

VASCONCELOS, K.R.F. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v.18, supl., p.733-738, Dez., 2008.

VEIGA JR., V.F., PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, n.2, p.273-286, 2002.

VEIGA JR., V.F., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V.S.; BARREIROE.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006.

WIPASA J, ELLIOTT S, XU H, GOOD MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunol Cell Biol**. 2002 Oct;80(5):401-14.

YOSHIMOTO, et al. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. **The Journal of Immunology**; v. 160, n. 11; p. 5500-5505, 1998.

GIOVANA ANDREIA GIBBERT DE SOUZA: É graduada em Ciências – Licenciatura Plena pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Mandaguari – PR (2004), tem especialização em Fisiologia Humana pela Universidade Estadual de Maringá – PR (2010) e mestrado em Biociências pela Universidade Federal do Oeste do Pará (2015). Atua como docente do curso de Medicina na Universidade do Estado do Pará, Campus de Santarém, onde ministra as disciplinas de Fisiologia Humana e Anatomia Humana.

Desenvolve projetos de pesquisa em duas linhas distintas: Sono e suas alterações endócrinas e comportamentais, e Malária, com enfoque em malária experimental e a atividade biológica de produtos naturais.

Atividade farmacológica
do óleo-resina da

Copaifera reticulata

em modelo experimental de *Malária*
com camundongos BALB/c



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena
Editora
Ano 2023

Atividade farmacológica
do óleo-resina da

Copaifera reticulata

em modelo experimental de *Malária*
com camundongos BALB/c



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena
Editora
Ano 2023